

**Chemotaxonomie ausgewählter Gram-positiver Bakterien anhand ihrer
polaren Lipide, Sequenzierung ihrer 16S rDNAs
und Vergleich beider Methoden**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Tanja Niepel
aus Bad Wildungen

1. Referent:

Prof. Dr. K. N. Timmis

2. Referent:

Prof. Dr. J. Wehland

eingereicht am:

06.05.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am:

02.07.1999

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Niepel, T., Meyer, H., Wray, V. und W.-R. Abraham. 1997 A new type of glycolipid, 1-[α -mannopyranosyl-(1 α -3)-(6-O-acyl- α -mannopyranosyl)]-3-O-acylglycerol, from *Arthrobacter atrocyaneus*. Tetrahedron **53**:3593-3602.

Niepel, T., Meyer, H., Wray, V. und W.-R. Abraham. 1998. Intraspecific variation of unusual phospholipids from *Corynebacterium spp.* containing a novel fatty acid. J. Bacteriol. **180**:4650-4657.

Korber, D. R., Wolfaardt, G. M., Brozel, V., MacDonald, R., und T. Niepel. Reporter systems for microscopic analysis of microbial biofilms. Methods in Enzymology, eingereicht.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Die Gruppe der coryneformen Bakterien..... | 3 |
| 1.1.1 | Taxonomie der Gattung <i>Cellulomonas</i> | 7 |
| 1.1.2 | Taxonomie der Gattung <i>Arthrobacter</i> | 7 |
| 1.1.3 | Taxonomie der Gattung <i>Agromyces</i> | 8 |
| 1.1.4 | Taxonomie der Gattung <i>Curtobacterium</i> | 9 |
| 1.1.5 | Taxonomie der Gattung <i>Nocardioides</i> | 9 |
| 1.1.6 | Taxonomie der Gattung <i>Terrabacter</i> | 10 |
| 1.1.7 | Taxonomie der Gattung <i>Aeromicrobium</i> | 10 |
| 1.1.8 | Taxonomie der Gattung <i>Aureobacterium</i> | 11 |
| 1.2 | Zielsetzung der Arbeit | 12 |
| 2. | Material und Methoden..... | 13 |
| 2.1 | Geräte..... | 13 |
| 2.2 | Material | 13 |
| 2.2.1 | Chemikalien | 13 |
| 2.2.2 | Verwendete Bakterienstämme | 14 |
| 2.2.2.1 | Typ- und Referenzstämme | 14 |
| 2.2.2.2 | Isolate | 16 |
| 2.2.2.3 | Referenzstämme für die <i>in situ</i> Hybridisierung..... | 19 |
| 2.2.3 | Verwendete Medien | 19 |
| 2.2.4 | Konservierung der Bakterienstämme..... | 21 |
| 2.3 | Chemotaxonomische Methoden | 22 |
| 2.3.1 | Anzucht der Stämme..... | 22 |
| 2.3.2 | Analyse der intakten Lipide | 22 |
| 2.3.2.1 | Extraktion der intakten Lipide..... | 22 |
| 2.3.2.2 | Auftrennung der intakten Lipide | 22 |
| 2.3.2.3 | Hydrolyse und Methylierung der intakten Lipide | 23 |
| 2.3.2.4 | Datenanalyse der methylierten Fettsäuren aus Glyko- und Phospholipide..... | 23 |
| 2.4 | Methoden der Strukturaufklärung..... | 24 |
| 2.4.1 | Analyse der intakten polaren Lipide | 24 |
| 2.4.1.1 | FAB-Massenspektroskopie..... | 24 |
| 2.4.1.2 | Tandem-Massenspektroskopie | 24 |
| 2.4.1.3 | NMR-Spektroskopie..... | 25 |
| 2.4.1.4 | Dünnschichtchromatographie..... | 25 |
| 2.4.2 | Strukturanalyse der Fettsäuren..... | 26 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 2.4.2.1 | Gaschromatographie..... | 26 |
| 2.5 | Molekularbiologische Techniken | 26 |
| 2.5.1 | Sequenzierung der 16S rDNA | 26 |
| 2.5.1.1 | Die Präparation der DNA | 26 |
| 2.5.1.2 | Die Polymerase-Kettenreaktion..... | 27 |
| 2.5.1.3 | Detektion und Aufreinigen der PCR-Produkte..... | 28 |
| 2.5.1.4 | DNA-Sequenzierung | 29 |
| 2.6 | <i>In situ</i> Einzelhybridisierung..... | 33 |
| 2.6.1 | Zellfixierung | 33 |
| 2.6.2 | Vorbehandlung der Objektträger | 34 |
| 2.6.3 | Immobilisierung der fixierten Zellen auf Objektträgern..... | 34 |
| 2.6.4 | Vorbehandlung zur Permeabilisierung von Gram-positive Paraformaldehyd-fixierten Zellen | 34 |
| 2.6.5 | <i>In situ</i> Hybridisierung | 35 |
| 2.6.6 | Kombination von <i>in situ</i> Einzelhybridisierung mit DAPI-Färbung | 36 |
| 2.6.7 | Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie..... | 36 |
| 2.6.8 | Verwendete und entwickelte Oligonukleotid-Sonden | 36 |
| 2.6.9 | Beschreibung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe..... | 37 |
| 2.7 | Charakterisierung der Struktur natürlicher Biofilme | 38 |
| 2.7.1 | Beschreibung des Standortes | 38 |
| 2.7.2 | Probennahme..... | 39 |
| 2.7.3 | Bestimmung des PCB-Gehaltes im Boden | 39 |
| 2.7.4 | Konstruktion von Mehrkanaldurchflußzellen | 40 |
| 2.7.5 | Aufwuchs der Biofilme..... | 40 |
| 2.7.6 | Mikroskopische Ausstattung..... | 41 |
| 2.7.7 | Analyse der mikrobiellen Besiedelung der Biofilme..... | 41 |
| 2.7.8 | Analyse der Biofilmtiefe..... | 42 |
| 2.7.9 | Direkte <i>in situ</i> Hybridisierung von Biofilmen | 42 |
| 2.7.10 | Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch konfokale Lasermikroskopie..... | 43 |
| 3. | Ergebnisse..... | 44 |
| Teil I: | | |
| Phylogenie und Chemotaxonomie von Referenzstämmen und Isolaten | | |
| coryneformer Bakterien..... | | |
| 3.1 | Chemotaxonomische Methoden zur Charakterisierung coryneformer Bakterien | 44 |
| 3.1.1 | Gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester der polaren Lipide | 44 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 3.1.2 | Reproduzierbarkeit der polaren Fettsäuremethylesterprofile..... | 46 |
| 3.1.3 | Fast-Atom-Bombardement (FAB)-Massenspektrometrie zur Analyse der polaren Lipide | 46 |
| 3.1.4 | Reproduzierbarkeit der polaren Lipidprofile | 48 |
| 3.2 | Die Gattung <i>Arthrobacter</i> | 49 |
| 3.3 | Die Gattung <i>Microbacterium</i> | 59 |
| 3.4 | Die Gattung <i>Cellulomonas</i> | 65 |
| 3.5 | Die Gattung <i>Curtobacterium</i> | 71 |
| 3.6 | Die Gattung <i>Nocardioides</i> | 77 |
| 3.7 | Die Gattung <i>Agromyces</i> | 82 |
| 3.8 | Die Gattung <i>Aeromicrobium</i> | 86 |
| 3.9 | Die Gattung <i>Terrabacter</i> | 88 |
| 3.10 | Fehlidentifizierungen innerhalb der Referenzstämme..... | 90 |
| 3.11 | Intergattungsspezifische Verwandtschaftsverhältnisse..... | 91 |
| 3.12 | Identifizierung von Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten..... | 98 |
| 3.12.1 | Isolate innerhalb der Familie <i>Microbacteriaceae</i> | 102 |
| 3.12.1.1 | Isolate innerhalb der Gattung <i>Microbacterium</i> | 102 |
| 3.12.1.2 | Isolate innerhalb der Gattungen <i>Agromyces</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Clavibacter</i> und <i>Curtobacterium</i> | 107 |
| 3.12.2 | Isolate innerhalb der Gattungen <i>Cellulomonas</i> und <i>Promicromonospora</i> | 112 |
| 3.12.3 | Isolate innerhalb der Unterordnung <i>Corynebacterineae</i> und der Familie <i>Nocardiaceae</i> | 117 |
| 3.12.4 | Isolate innerhalb der Gattung <i>Arthrobacter</i> | 123 |
| 3.13 | Der Einfluß verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Fettsäurezusammensetzung ausgewählter coryneformer Bakterien | 128 |
| 3.14 | Der Einfluß verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung der intakten polaren Lipide ausgewählter coryneformer Bakterien..... | 131 |
| 3.15 | Identifizierung potentieller Lipidbiomarker | 134 |
| 3.15.1 | Ein neuer Glykolipidtyp aus <i>Arthrobacter atrocyaneus</i> | 134 |
| 3.15.2 | Eine neue Fettsäure aus <i>Corynebacterium spp.</i> | 135 |
| 3.16 | Entwicklung von Oligonukleotid-Sonden | 139 |
| 3.16.1 | Permeabilisierung Gram-positiver Bakterien mit hohem GC-Gehalt (GPHGC)..... | 139 |
| 3.16.2 | Die Sonde MIB 756: Spezifisch für die Gattung <i>Microbacterium</i> | 140 |
| 3.16.3 | Die Sonde CEL 1030: Spezifisch für die Gattungen <i>Cellulomonas</i> und <i>Promicromonospora</i> | 141 |
| 3.16.4 | Die Sonde TER 821: Spezifisch für die Gattung <i>Terrabacter</i> | 142 |
| 3.16.5 | Einstellung optimaler Hybridisierungsbedingungen..... | 142 |

Teil II:**Charakterisierung der Struktur natürlicher Biofilme aus einem PCB-belasteten Standort mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Sonden unter Einsatz der konfokalen Lasermikroskopie 143**

| | | |
|--------|--|------------|
| 3.17 | Standort und Versuchsablauf | 143 |
| 3.18 | Entwicklung und Struktur mikrobieller Biofilme aus unterschiedlich stark PCB-belasteten Bodenproben | 144 |
| 3.18.1 | Zelldichte und Biofilmtiefe | 146 |
| 3.18.2 | Zellgröße und Morphologie | 146 |
| 3.19 | Analyse der bakteriellen Zusammensetzung von Biofilmen mit Hilfe von <i>in situ</i> Hybridisierung | 148 |
| 3.19.1 | Optimierung der <i>in situ</i> Hybridisierung an Modellbiofilmen in Durchflußzellen | 148 |
| 3.19.2 | Auswirkungen der <i>in situ</i> Hybridisierung auf die Struktur der Biofilme | 149 |
| 3.19.3 | <i>In situ</i> Hybridisierung eines natürlichen Biofilms in Durchflußzellen | 150 |
| 4. | Diskussion | 153 |

Teil I:**Vergleich chemotaxonomischer und phylogenetischer Methoden****zur Charakterisierung coryneformer Bakterien 153**

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1 | Polyphasische Identifizierung ausgewählter coryneformer Bakterien | 154 |
| 4.1.1 | FAME-Profil | 154 |
| 4.1.2 | Profile der intakten polaren Lipide | 157 |
| 4.1.3 | 16S rDNA-Sequenzierung | 158 |
| 4.1.4 | Polyphasische Analyse ausgewählter Isolate | 159 |
| 4.1.5 | Vergleich der Methoden | 162 |
| 4.2 | Entwicklung von Oligonukleotid-Sonden | 168 |

Teil II:**Entwicklung, Struktur und Zusammensetzung mikrobieller Biofilme****aus unterschiedlich stark PCB-belasteten Bodenproben 169**

| | | |
|-------|--|------------|
| 4.3 | Durchflußzellen als Modellsystem für die Studie mikrobieller Biofilme | 170 |
| 4.3.1 | Der Einfluß des PCB-Belastungsgrades auf die Entwicklung und Struktur von Biofilmen | 170 |
| 4.3.2 | <i>In situ</i> Hybridisierung von Biofilmen in Durchflußzellen | 171 |
| 4.3.3 | Analyse der bakteriellen Zusammensetzung natürlicher Biofilme mit Hilfe der <i>in situ</i> Hybridisierung | 172 |
| 4.3.4 | Abschließende Betrachtung und Ausblick | 173 |
| 5. | Zusammenfassung | 174 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 175 |
| 7. | Anhang | 192 |

Abkürzungen

| | |
|----------------|--|
| A | Adenosin oder Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| <i>Ae.</i> | <i>Aeromicrobium</i> |
| Ag. | <i>Agromyces</i> |
| Ar. | <i>Arthrobacter</i> |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| <i>Au.</i> | <i>Aureobacterium</i> |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| <i>Ce.</i> | <i>Cellulomonas</i> |
| CID | Collision Induced Decomposition |
| <i>Cu.</i> | <i>Curtobacterium</i> |
| dec | Decade |
| dest. | destilliert |
| rDNA | ribosomale Desoxyribonucleinsäure |
| DSMZ | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytosintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| dNTPs | Desoxynukleosidtriphosphat |
| ddNTPs | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiaminetetraessigsäure |
| EMBL | European Molecular Biology Laboratory |
| et al. | und von anderen |
| FAB | Fast Atom Bombardment |
| FAME | Fettsäuremethylester (fatty acid methyl ester) |
| G | Guanosin oder Guanin |
| g | Gramm |
| <i>g</i> | Einheit der Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| l | Liter |
| LMG | Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiology, Rijksuniversiteit Gent |
| M | Mol/l |
| <i>Mi.</i> | <i>Microbacterium</i> |
| mg | Milligramm |
| µg | Mikrogramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| <i>No.</i> | <i>Nocardioides</i> |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| RDP | Ribosomal RNA Database Project |
| RNA | Ribonukleinsäure |

| | |
|-----------|--|
| rpm | Umdrehungen (Runde) pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sog. | sogenannte |
| <i>T.</i> | <i>Terrabacter</i> |
| T | Thymidin oder Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyldiamin |
| Tris | Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Enzymeinheit (unit) |
| VKM (BKM) | All-Russian Collection of Microorganisms, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russ. Academy of Sciences, Pushchino, Russia |

1. Einleitung

Mikroorganismen sind in jedem Winkel der Erde beheimatet. Ihre außerordentliche komplexe physiologische Flexibilität erlaubt es ihnen, auch sehr lebensfeindliche Regionen zu besiedeln. Das Spektrum der Habitate reicht von siedend heißen Quellen über die von Dauerfrost geprägten Gebiete der Arktis und Antarktis, Tiefseegräben und tiefen Gesteinsschichten bis hin zur angenehm temperierten Gartenerde.

Obwohl die Menschheit seit tausenden von Jahren metabolische Aktivitäten von Mikroorganismen nutzt, um Käse, Wein oder Brot herzustellen, wurden mikrobielle Sekundärstoffe erst vor rund 50 Jahren als Quellen neuer chemischer und pharmazeutischer Produkte entdeckt. Heute werden Mikroorganismen außerdem als Lebendimpfstoffe, zum Pflanzenschutz, der biologischen Sanierung anthropogen belasteter Böden und zur biologischen Reinigung von Abwässern eingesetzt, um nur einige Beispiele des diversen Aufgabenspektrums zu nennen. Die Gesamtheit aller Mikroorganismen besitzt somit eine Fülle metabolischer Aktivitäten, die von höheren Organismen in dieser Form nicht erbracht werden können. Um dieses Potential in Zukunft biotechnologisch effektiver nutzen und die Artenstruktur mikrobieller Gemeinschaften charakterisieren zu können, ist die Entwicklung schneller und zuverlässiger Identifizierungsmethoden von entscheidender Bedeutung.

Bereits heute sind tausende unterschiedlicher Mikroorganismen bekannt. Schätzungen gehen jedoch davon aus, daß weniger als 1% der die Atmosphäre bewohnenden Bakterien bisher isoliert und charakterisiert sind (Snyder und Champness, 1997). Mit der Einführung direkter mikroskopischer Zählverfahren wurde zudem deutlich, daß aus Umweltproben nur etwa 0,1-10%, in Abhängigkeit von Trophiegrad sogar häufig noch wesentlich weniger, der lebenden Organismen erfaßt werden können (Jannasch und Jones, 1959; Roszak und Colwell, 1987; Amann et al., 1995a). Dieses Phänomen wurde von Stayley und Konopka (1985) als "Platecount-Anomalie" bezeichnet. Traditionelle Methoden, die auf der Kultivierung von Bakterien beruhen, haben sich daher für die Identifizierung, Quantifizierung und funktionelle Charakterisierung natürlicher mikrobieller Lebensgemeinschaften von begrenztem Wert erwiesen. Aus diesem Grund hat sich die Identifizierung von Bakterien in den letzten Jahren von morphologisch-physiologischen hin zu den leistungsfähigeren molekularbiologisch-chemotaxonomischen Methoden entwickelt.

Als die Methode mit dem derzeit größten Potential zur taxonomischen Charakterisierung von Mikroorganismen hat sich die 16S rRNA-Sequenzierung erwiesen. Die Vorteile dieser phylogenetischen Markermoleküle sind ihr Vorkommen in allen Organismen als essentielle Komponenten der Proteinbiosynthese, ihre konservierte Molekülstruktur und -funktion sowie

ihre Unabhängigkeit von Kulturbedingungen. Die Primärstrukturen der 16S rRNA-Gene enthalten stark konservierte, variable und hochvariable Regionen, die sich unabhängig voneinander entwickelt haben. Ausgehend von Arbeiten von Zuckermandl und Pauling (1965) stellten C. Woese und Mitarbeiter (1987) fest, daß der Grad der Ähnlichkeit der ribosomalen RNA-Gene verschiedener Organismen Auskunft über ihre phylogenetische Verwandtschaft gibt und Signatur-Sequenzen existieren, die für eine Art, Familie oder auch eine Gruppierung höherer Ordnung charakteristisch sind. Daher eignen sich 16S rRNA-Sequenzen für eine taxonomische Eingruppierung von den großen Domänen bis hin zur Artebene (Amann et al., 1995a). Der Vergleich der rRNA-Sequenzen von Mikroorganismen ermöglichte zum ersten Mal die Entwicklung einer phylogenetisch begründeten Taxonomie auf breiter Basis (Pace, 1997; Hugenholtz et al., 1998). Diese Art der taxonomischen Untersuchung ist nicht auf Reinkulturen beschränkt. Durch die Generierung von Klonbanken und anschließender Sequenzierung der klonierten 16S rRNA-Genfragmente in Verbindung mit fluoreszenzmarkierten phylogenetischen Sonden ist man heute in der Lage, auch Umweltproben kultivierungsunabhängig taxonomisch zu charakterisieren (Ward et al., 1990; Amann et al., 1990a,b; Schmidt et al., 1991; Amann et al., 1995a; Snaird et al., 1997). Basierend auf der Amplifikation des 16S rRNA-Gens wurden zahlreiche molekularbiologische Methoden zur Beschreibung der mikrobiellen Diversität eines Habitats entwickelt. Als Beispiele seien hier nur die Analyse von PCR-Produkten durch Denaturing Gradient Gel Elektrophoresis (DGGE; Muyzer et al., 1993) und Amplified Ribosomal DNA Restriction Aalysis (ARDRA; Vaneechouette, 1992) genannt.

Als weitere Identifizierungsmethode wurden 1988 die niedermolekularen RNA-Profile (5S rRNA, tRNA) von M. Höfle eingeführt. Diese können sowohl Hinweise auf die taxonomische Struktur bakterieller Lebensgemeinschaften geben als auch zur Detektion ihrer saisonalen Veränderungen eingesetzt werden (Höfle, 1992; Höfle und Brettar, 1995).

Auch immunologische Testsysteme (Antikörpersonden) können zur Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen dienen. Während diese Technik zur Identifizierung von pathogenen Bakterienstämmen seit Jahren etabliert ist, kann sie in zunehmendem Maße auch zur Analyse mikrobieller Ökosysteme genutzt werden (Macario et al., 1983,1985; Muthari et al., 1985; Faude und Höfle, 1997). Die Methode des *Westprintings* (Western-Blot und immunologisches Fingerprinting) vereint bakterielle Fingerprints, die durch Auftrennung der Gesamtzellproteine generiert werden, mit dem immunologischen Ansatz und schafft somit eine Identifizierungsmöglichkeit, die durch Variation der Spezifität des eingesetzten Serums gruppen-, gattungs- und artspezifisch eingesetzt werden kann (Tesar et al., 1996).

Die gaschromatographische Analyse von Fettsäuren zur Identifizierung von Bakterien hat seit der Einführung dieser Methode durch Abel und seine Mitarbeiter (1963) in vielen Fällen übereinstimmende Ergebnisse mit DNA-DNA Hybridisierungen gegeben und findet heute

eine breite Anwendung bei der Identifizierung von klinischen, aber auch von Umweltisolaten. Diese Technik zeichnet sich durch die Einfachheit der analytischen Methode, Schnelligkeit und einen geringen Materialaufwand aus. Die Methode hat sich weiterhin als geeignet herausgestellt, um „Fingerprints“ von *in situ* Gemeinschaften im Boden, dem Grundwasser und anderen Habitaten zu erhalten, da die Fettsäuren der Phospholipide (PLFA) einen relativ stabilen Prozentsatz der bakteriellen Biomasse darstellen und ihre natürliche Variabilität ausreicht, um signifikante Fettsäuremuster für verschiedene wichtige Bakteriengruppen erkennen zu können. So wurden Fettsäureprofile z. B. schon dazu eingesetzt, den Effekt organischer Kontaminationen oder die Auswirkungen von Schwermetallen auf die Zusammensetzung natürlicher Bakteriengemeinschaften in Böden zu verfolgen (White, 1986, Frostegard et al., 1993). Der schnelle Abbau der Phospholipide bietet hierbei den Vorteil, daß nur lebende Organismen erfaßt werden (White et al., 1979).

Weiterentwicklungen im Bereich der Strukturaufklärung ermöglichen es zunehmend, nicht nur die Fettsäuren aus komplexen Gemischen zu analysieren, sondern auch die intakten polaren Lipide. Dies hat den Vorteil, daß Informationen über den Charakter der polaren Gruppe und die Kombination der Fettsäuren erhalten bleiben. Es konnte bereits gezeigt werden, daß sich die polaren Lipide durch eine große strukturelle Vielfalt auszeichnen (Abraham et al., 1997). Hinzu kommt jedoch, daß es polare Lipide gibt, die für bestimmte Bakteriengruppen charakteristisch sind. Diese beiden Merkmale offenbaren, daß die polaren Lipide für eine chemotaxonomische Einteilung von Bakterientaxa sehr gut geeignet sind (Abraham et al., 1997).

1.1 Die Gruppe der coryneformen Bakterien

Zur Gruppe der coryneformen Bakterien gehören eine Reihe von Gattungen Gram-positiver, asporogener und pleomorph wachsender Stäbchen-Bakterien mit einem hohen G+C-Gehalt der DNA. Sie sind sowohl im Wasser als auch im Boden abundant, konnten aber zusätzlich bereits in zahlreichen anthropogenen Standorten wie Belebungsbecken von Kläranlagen (Kämpfer et al., 1996b, Bieskiewicz et al., 1995) oder Biofiltern (Bendinger et al., 1992) nachgewiesen wurden. Weiterhin zeigen sie eine große physiologische Bandbreite und sind daher von industriellem Interesse. So haben sie z. B. bei der Produktion von Glutaminsäure und anderen Aminosäuren industrielle Bedeutung erlangt. Die Bakterien dieser Gruppe zeichnen sich zudem durch ein hohes katabolisches Potential zur Mineralisation von schwerabbaubaren Xenobiotica aus und sind daher auch von ökologischem und biotechnologischem Interesse. So sind sie in der Lage, polyhalogenierte Phenole (McAllister et. al, 1996), Cyanide (Dubey und Holmes, 1995), Biphenyle (Higson, 1992) und Dibenzothiophene (Wang und Krawiec, 1994) effektiv abzubauen. Im Laufe der Jahre stellte sich heraus, daß es sich bei diesen Bakterien, die ursprünglich vor allem aufgrund

morphologischer Merkmale zusammengefaßt wurden, um eine sehr heterogene Organismengruppe handelt. Der verstärkte Einsatz chemotaxonomischer und molekulargenetischer Methoden in der bakteriellen Systematik führte zu einer signifikanten Verbesserung der Taxonomie der coryneformen Bakterien. Als Resultat dieser Untersuchungen wurden zahlreiche Spezies dieser Bakteriengruppe reklassifiziert und neue Gattungen etabliert. Als Beispiel sei hier nur die Überführung pflanzenpathogener coryneformer Bakterien in verschiedene Gattungen wie *Rhodococcus* (Goodfellow, 1984) und *Curtobacterium* (Collins und Jones, 1983d) sowie die Schaffung der beiden neuen Gattungen *Aureobacterium* (Collins et al., 1983a) und *Clavibacter* (Davis et al., 1984) genannt.

Kürzlich wurde von Stackebrandt et al. (1997) ein neues Klassifikationssystem für die zur Ordnung *Actinomycetales* gehörenden Familien vorgeschlagen. Dieses System basiert auf 16S rRNA Sequenzähnlichkeiten und der Präsenz taxonspezifischer 16S rRNA/DNA Signaturnukleotiden. Hiernach stellt sich die phylogenetische Situation im Umfeld der coryneformen Bakterien derzeit folgendermaßen dar:

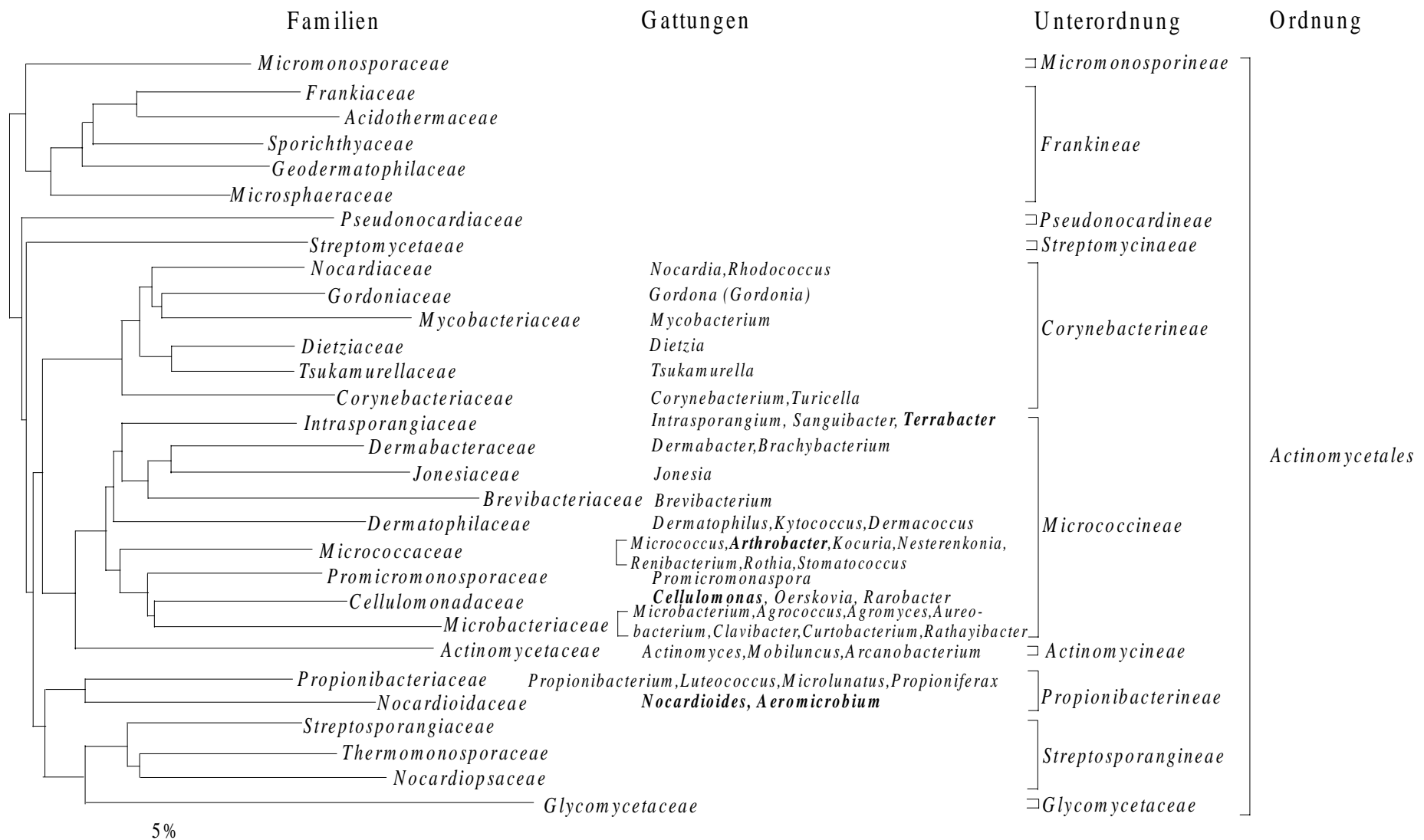


Abb. 1.1: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den einzelnen Gattungen der coryneformen Bakterien. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 5% . Die in dieser Arbeit analysierten Gattungen sind hervorgehoben dargestellt. Verändert aus Stackebrandt et al., 1997.

Bei den in der Vergangenheit durchgeführten Studien kristallisierten sich die folgenden chemotaxonomischen Eigenschaften als geeignete Marker für die Unterscheidung der coryneformen Bakterien auf Gattungsebene heraus. Stellvertretend sind hier nur die in dieser Arbeit analysierten Gattungen aufgeführt. Die in der Tabelle zusammengestellten charakteristischen Parameter stellen Literaturdaten dar, welche verschiedenen Veröffentlichungen entnommen wurden (Yokota et al., 1993; Tamura und Yokota, 1994; Klatte et al., 1996; Martin et al., 1997; Takeuchi und Hatano, 1998).

Tab. 1.1: Diagnostische Unterschiede zwischen den analysierten und verwandten Gattungen der coryneformen Bakterien.

| Taxon | Charakteristika | | | | | |
|---|---------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| | Peptidoglycan | | Fettsäure- profil ^c | polare Lipide | Menachinone | G+C-Gehalt [mol%] |
| | Gruppe ^a | Diamino- säure ^b | | | | |
| <i>Aeromicrobium</i> | A3γ | LL-DAP | S, A, U, T | PE, PG | MK-9(H ₄) | 71-73 |
| <i>Agromyces</i> | B2γ | DAB | S, A, I | DPG, PG | MK-11,12 | 71-76 |
| <i>Arthrobacter</i> (globiformis-Gruppe) | A3α | Lys | S, A, I | DPG, PG, (PI), GL | MK-9(H ₂) | 59-70 |
| <i>Arthrobacter</i> (nicotianae-Gruppe) | A4α | Lys | S, A, I | DPG, PG, (PI), GL | MK-9, MK-8 | 59-69 |
| <i>Aureobacterium</i> | B2β, B2α | D-Orn | S, A, I | DPG, PG, GL | MK-11,12,13,14 | 65-76 |
| <i>Microbacterium</i> | B1β, B1α | L-Lys | S, A, I | DPG, PG, GL, (PGL) | MK-11,12 | 66-69 |
| <i>Microbacterium</i> (neudefiniert) | | L-Lys/ D-Orn | S, A, I | DPG, PG, GL | MK-11,12,13,14 | 65-72 |
| <i>Cellulomonas</i> | A4β,A4 α | L-Orn | S, A, I | DPG, PI, PGL | MK-9(H ₄) | 71-76 |
| <i>Curtobacterium</i> | B2β | D-Orn | S, A, I | DPG, PG | MK-9 | 68-75 |
| <i>Nocardioides</i> | A3γ | LL-DAP | I, S, A, U, T | PG, PI, PIM, APG | MK-8(H ₄) | 65-72 |
| <i>Terrabacter</i> | A3γ | LL-DAP | I, S, A, U | DPG, PE, PI, PGL | MK-8(H ₄) | 69-72 |
| <i>Rhodococcus</i> | A1γ | LL-DAP | S, U, T | DPG, PI, PE, PIM | MK-8(H ₂) | 63-73 |
| <i>Corynebacterium</i> | A1γ | meso- DAP | S, U | DPG, PI, PIM | MK-9,8(H ₂) | 51-67 |
| <i>Mycobacterium</i> | B | meso- DAB | S, U, T | DPG, PG, PE, PI, PIM | MK-9(H ₂) | 62-70 |
| <i>Clavibacter</i> | B2γ | L-DAB | S, A, I | DPG, PG, GL | MK-9,10 | 67-78 |
| <i>Gordonia</i> | B | meso- DAB | S, U, T | DPG, PG, PE, PI, PIM | MK-9(H ₂) | 63-69 |

^a Bezeichnung nach Schleifer und Kandler (1972).

^b Orn, Ornithin; Lys, Lysin; DAP, Diaminopimelinsäure; DAB, Diaminobuttersäure

^c S, unverzweigt-gesättigt; U, einfachungesättigt; I, *iso*-verzweigt; A, *anteiso*-verzweigt; T, 10-Methyl-verzweigt (Tuberculoctearinsäure)

^d DPG, Diphosphatidylglycerin; PE, Phosphatidylethanolamin; PI, Phosphatidylinositol; PG, Phosphatidylglycerin; GL, Glykolipide; PIM, Phosphatidylinositoldimannosid; APG, Acylphosphatidylglycerin; PGL, Phosphoglykolipide

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes "High Resolution Automated Microbial Identification and Application to Biotechnologically Relevant Ecosystems" durchgeführt. Ziel dieses Projektes war die Entwicklung neuer Technologien, die als Basis für neue automatisierte Methoden zur schnellen, zuverlässigen und kostengünstigen Identifizierung von Mikroorganismen dienen können. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit

beschriebenen Ansätzen wurden von den Kooperationspartnern ein großes Spektrum weiterer Technologien für die Identifizierung der coryneformen Bakterien in Reinkulturen und Umweltproben etabliert. Hierzu gehören die Entwicklung rekombinanter und konventioneller mono- und polyklonaler Antikörper, die Analyse von 5S rRNA und tRNA-Profilen, die Analyse der Gesamtzellproteine mittels eindimensionaler SDS-PAGE sowie unterschiedliche Fingerprinttechniken (AFLP, TGGE, Ribotyping). Die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Lösungsansätze sollte verglichen und an einer taxonomisch problematischen Bakteriengruppe wie die der coryneformen validiert werden. Die im folgenden vorgestellten Referenzorganismen wurden von den Kooperationspartnern als besonders geeignete Modellgruppe zusammengestellt.

1.1.1 Taxonomie der Gattung *Cellulomonas*

Die Gattung *Cellulomonas* (Bergey et al., 1923) wurde ursprünglich für Gram-negative, bewegliche oder unbewegliche, kurze Stäbchen definiert, die in der Lage sind, Cellulose abzubauen. Später stellte man beim Färbeverhalten in der Gram-Färbung fest, daß es sich um Gram-positive Zellen handelt, die sehr schnell entfärbt werden. Charakteristisch für die Zellwandzusammensetzung ist ein über D-Asparaginsäure in *Cellulomonas flavigena* und D-Glutaminsäure in allen anderen *Cellulomonas*-Spezies (Fiedler und Kandler, 1973) verknüpftes Peptidoglycan der Variation A4β. Gattungsspezifisch sind zudem tetrahydrogenisierte Menachinone mit 9 Isoprenoideinheiten sowie ein Fettsäureprofil aus iso- und anteiso-verzweigten Fettsäuren, der ungewöhnlichen Tridecansäure und einem relativ hohen Anteil an unverzweigten Fettsäuren (Minnikin et al., 1979). Die polaren Lipide setzen sich aus Diphosphatidylglycerin (DPG), Phosphatidylinositol (PI) und zwei bisher nicht identifizierten Phosphoglykolipiden zusammen (Minnikin et al., 1979). Die Vergleiche von 16S rRNA-Sequenzen machten deutlich, daß die beiden Gattungen *Cellulomonas* und *Oerskovia* eine phylogenetisch kohärente Gruppe bilden (Stackebrandt et al., 1980b). Trotz morphologischer und chemotaxonomischer Unterschiede wurde von den Autoren daher die Überführung der Spezies *Oerskovia turbata* und *O. cellulans* in die Gattung *Cellulomonas* vorgeschlagen (Stackebrandt et al., 1982), so daß die Gattung *Cellulomonas* zur Zeit 10 Spezies enthält (Stackebrandt und Keddle, 1986). *Cellulomonas cellulans* nimmt innerhalb der Gattung eine phylogenetische (Rainey et al., 1995) und chemotaxonomische (Peptidoglycantyp A4α) Sonderstellung ein.

1.1.2 Taxonomie der Gattung *Arthrobacter*

Die Gattung *Arthrobacter* wurde von Conn und Dimmick (1947) für obligate Aerobier etabliert, die einen charakteristischen Wachstumszyklus durchlaufen. In der stationären Phase liegen die Arthrobakterien als kokkoide Zellen vor. Beim Überimpfen in ein frisches Komplexmedium wachsen diese zu unregelmäßig geformten Stäbchen an, die wieder in

kokkoide Zellen zerfallen. Beide Zellformen sind Gram-positiv. Aufgrund dieser unspezifischen diagnostischen Kriterien entwickelte sich die Gattung im Laufe der Jahre zu einer heterogenen Organismensammlung. Neuere chemotaxonomische Methoden sowie die Einführung der 16S rRNA-Sequenzierung zur Identifizierung von Bakterien machten die Reklassifizierung zahlreicher Arthrobakterien und die Überführung einiger Spezies aus anderen Gattungen in die Gattung *Arthrobacter* notwendig (Collins et al., 1983d; Suzuki und Komagata, 1983; Stackebrandt, 1983; Kodama et al., 1992; Koch et al., 1995b). Basierend auf der Peptidoglycanstruktur und der Lipidzusammensetzung ist die Gattung *Arthrobacter* in zwei Gruppen aufgeteilt. Die sog. *Arthrobacter globiformis/citreus*-Gruppe ist durch ein Peptidoglycan der Variation A3 α und dihydrogenierte Menachinone mit 9 Isoprenoideinheiten charakterisiert. Hingegen sind die Spezies, die zur *Arthrobacter nicotianae/sulfureus*-Gruppe gehören, durch die Peptidoglycanvariation A4 α und ungesättigte Menachinone mit 8 oder 9 Isoprenoideinheiten gekennzeichnet. Das Fettsäureprofil ist bei allen Arthrobakterien einheitlich und besteht neben iso- und anteiso-verzweigten aus kleineren Mengen an unverzweigten Fettsäuren (Keddie und Jones, 1986; Kodama et al., 1992). Die polaren Lipide setzen sich aus verschiedenen Glykolipiden, wie DPG und PG sowie PI zusammen (Shaw und Stead, 1971; Collins et al., 1982). Durch die wachsende Datenbank an 16S rRNA-Sequenzen wurde deutlich, daß auch heute noch eine gewisse Heterogenität innerhalb der Gattung *Arthrobacter* besteht. Die o.a. traditionelle Einteilung der Gattung konnte durch phylogenetische Studien nicht bestätigt werden (Koch et al., 1994).

1.1.3 Taxonomie der Gattung *Agromyces*

Die Gattung *Agromyces* wurde 1969 von Gledhill und Casida für die Spezies *Agromyces ramosus*, ein filamentös verzweigter Actinomycet ohne Katalase-Aktivität, geschaffen. 1992 wurden die beiden neuen Arten *Agromyces cerinus* und *A. fucosus* von Zgurkskaya und Mitarbeitern beschrieben. Sie erweiterten die Definition der Gattung um Spezies mit Katalase-Aktivität. Nach der kürzlich erfolgten Reklassifizierung von "*Corynebacterium mediolanum*" zu *Agromyces mediolanus* (Suzuki et al., 1996) enthält die Gattung derzeit vier Spezies. Die *Agromyces*-Spezies sind durch ein über 2,4-Diaminobuttersäure verknüpftes Peptidoglycanvariation B2 γ (Schleifer und Kandler, 1972) gekennzeichnet. Diese Zellwandzusammensetzung ist auch bei den Gattungen *Clavibacter* und *Rathayibacter* zu finden. Trotz dieser Übereinstimmung können *Agromyces*-Spezies eindeutig durch ihr Hauptmenachinon MK-12 von den verwandten Gattungen unterschieden werden. Auch die Analyse der 16S rRNA-Sequenzen von Vertretern dieser drei Gattungen bestätigte, daß es sich um drei phylogenetisch kohärente Gruppen innerhalb der coryneformen Bakterien handelt (Suzuki et al., 1996).

1.1.4 Taxonomie der Gattung *Curtobacterium*

In der Gattung *Curtobacterium* wurden von Yamada und Komagata (1972) bewegliche, ursprünglich als Brevibakterien klassifizierte Spezies mit den beiden phytopathogenen Arten *Corynebacterium flaccumfaciens* und *C. poinsettii* zusammengefaßt. Collins und Jones (1983d) schlugen die zusätzliche Aufnahme von *Corynebacterium betae*, *C. oortii* und *C. poinsettii* als Pathovare von *Curtobacterium flaccumfaciens* vor. Auf der Basis verschiedener chemotaxonomischer und molekularbiologischer Studien (Schleifer und Kandler, 1972; Döpfer et al., 1982) wurden die beiden Spezies *Curtobacterium saperdae* und *Cu. testaceum* in die neugeschaffene Gattung *Aureobacterium* überführt (Collins et al., 1983a), so daß die Gattung *Curtobacterium* zur Zeit 6 Spezies enthält. Curtobakterien besitzen die Peptidoglycanvariation B2 β sowie Diphosphatidylglycerin (DPG) und Phosphatidylglycerin (PG) als wichtigste polare Lipide (Collins et al., 1980c). Die Zellwandzucker variieren innerhalb der Gattung stark, d.h. sie weisen keine gattungs- oder speziesspezifische Zusammensetzung auf. Das Fettsäureprofil besteht aus unverzweigten, gesättigten sowie iso- und anteiso-verzweigten, gesättigten Fettsäuren (Suzuki und Komagata, 1983), während MK-9 als Menachinon auftritt.

1.1.5 Taxonomie der Gattung *Nocardioides*

Die Gattung *Nocardioides* wurde 1976 von Prauser für eine Gruppe von Gram-positiven Bakterien mit geringer Säurefestigkeit geschaffen. Die Mitglieder haben einen aeroben Stoffwechsel und bilden Mycele aus, welche in unregelmäßige, stäbchen- und kokkenförmige Fragmente zerbrechen. Die Gattung *Nocardioides* enthält zur Zeit die fünf Arten *No. albus* (Prauser, 1976) als Typspezies sowie *No. luteus* (Prauser, 1984), *No. jensenii* (Collins et al., 1989), *No. plantarum* (Collins et al., 1994) und *No. simplex* (O'Donnel, 1982). Die letzteren drei Spezies bilden keine Mycele. Diese morphologische Heterogenität innerhalb der Gattung *Nocardioides* macht die Verwendung von chemotaxonomischen Markern notwendig. Charakteristischerweise verfügen *Nocardioides*-Spezies über Diaminopimelinsäure in der Zellwand und ein komplexes Fettsäureprofil mit iso-, anteiso- und 10-Methyl-verzweigten, daneben aber auch unverzweigten und ungesättigten Fettsäuren. Als Chinon tritt überwiegend das tetrahydrogenierte Menachinon mit 8 Isoprenoideinheiten auf; die Phospholipide setzen sich aus PG, PI, PIM und APG zusammen (Lechevalier et al., 1977, 1981).

1.1.6 Taxonomie der Gattung *Terrabacter*

Eine Analyse der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Gattungen *Nocardioides* (Prauser, 1976) und *Pimelobacter* (Suzuki und Komagata, 1983) führte praktisch zur Auflösung letzterer. *Pimelobacter jensenii* wurde in die Gattung *Nocardioides* überführt und für die Spezies *Pimelobacter tumescens* wurde die neue Gattung *Terrabacter* geschaffen (Collins et al., 1989a). Die beiden Gattungen *Terrabacter* und *Nocardioides* unterscheiden sich von den anderen coryneformen Bakterien durch ihre ungewöhnliche Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren. Sie produzieren eine komplexe Mischung aus gesättigten-unverzweigten, einfachungesättigten sowie iso- und anteiso-verzweigten Fettsäuren (Collins et al. 1983b; O'Donnell et al., 1982; Suzuki et al., 1983). *Terrabacter tumescens* kann jedoch von der Gattung *Nocardioides* durch das Fehlen von 10-Methyl-verzweigten Fettsäuren eindeutig unterschieden werden. Ein weiteres, für die Unterscheidung auf Gattungsebene geeignetes Kriterium ist die Zusammensetzung der polaren Lipide. *Terrabacter tumescens* besitzt neben Diphosphatidylglycerin (DPG), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinositol (PI) einige Stickstoff enthaltende Phosphoglycolipide, die bisher nicht identifiziert werden konnten. Letztgenannte fehlen in *Nocardioides*-Spezies und können daher als weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Gattungen dienen. Andere, für die Klassifizierung auf Gattungsebene wichtige chemotaxonomische Marker sind die über Diaminopimelinsäure verknüpfte Peptidoglycane der Variation A3 γ und tetrahydrogenierte Menachinone mit 8 Isoprenoideinheiten.

1.1.7 Taxonomie der Gattung *Aeromicrobium*

Miller et al. (1991) etablierten die Gattung *Aeromicrobium* für einen einzigen Stamm, *Arthrobacter* sp. NRRL B-3381. Dieses nicht-sporulierende, nicht-mycelbildende Bakterium zeichnet sich durch die Bildung des Antibiotikums Erythromycin aus (French, 1970). Die ursprüngliche Einteilung in die Gattung *Arthrobacter* war ausschließlich aufgrund phänotypischer Merkmale vorgenommen worden, konnte aber durch chemotaxonomische und phylogenetische Untersuchungen nicht bestätigt werden (Miller et al., 1991). Die Reklassifizierung von *Nocardioides fastidiosa* zu *Aeromicrobium fastidiosum* führte zu einer erweiterten Gattung *Aeromicrobium* (Tamura und Yokota, 1994). *Aeromicrobium*-Spezies werden als unbewegliche, Gram-positive unregelmäßige Stäbchen oder Kokken beschrieben. Diaminopimelinsäure als Bestandteil der Zellwand, tetrahydrogenierte Menachinone mit 9 Isoprenoideinheiten sowie ein Fettsäuremuster aus unverzweigten, anteiso-verzweigten und einfachungesättigten Fettsäuren, in dem zusätzlich Tuberculostearinsäure enthalten ist, gelten als gattungsspezifische Charakteristika. Als intakte polare Lipide treten PG und PE auf.

1.1.8 Taxonomie der Gattung *Aureobacterium*

Die Gattung *Aureobacterium* wurde von Collins et al. (1983) für die atypischen Curtobakterien *C. saperdae* und *C. testaceum* sowie die Spezies “*Microbacterium liquefaciens*”, *Arthrobacter terregens*, *Arthrobacter flavescens* und “*Corynebacterium barkeri*” geschaffen. 1993 wurde die Gattung um 7 weitere auf insgesamt 13 beschriebene Spezies erweitert (Yokota et al., 1993). Im Laufe der letzten Jahre wurde deutlich, daß die Organismen der beiden Gattungen *Aureobacterium* und *Microbacterium* phylogenetisch miteinander vermischt sind, zusammen aber eine monophyletische Gruppierung darstellen (Rainey et al., 1994; Takeuchi und Yokota, 1994). Diese Ergebnisse wurden in einer erweiterten Studie von Takeuchi und Hatano (1998) bestätigt. Die Autoren schlugen daraufhin die Vereinigung der beiden Gattungen zu einer erweiterten Gattung *Microbacterium* vor, obwohl Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung bestehen. In der Zellwand der Microbakterien-Spezies (Peptidoglycantyp B1) ist L-Lysin als Diaminosäure gebunden (Schleifer 1970; Schleifer und Kandler, 1972) während diese Position in der Zellwand (Peptidoglycantyp B2) der Gattung *Aureobacterium* von D-Ornithin eingenommen wird (Yokota et al., 1993). Bezüglich der anderen chemotaxonomischen und phänotypischen Merkmale weisen die Gattungen große Übereinstimmungen auf. Beide sind durch Menachinome mit 11, 12 oder 13 Isoprenoideinheiten, einem Fettsäuremuster aus unverzweigt-gesättigten, iso- und anteiso-verzweigten Fettsäuren sowie den polaren Lipiden Diphosphatidylglycerin (DPG), Phosphatidylglycerin (PG) und Glykolipiden (GL) gekennzeichnet.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer polyphasischen Identifizierungsstrategie für ausgewählte Gattungen der coryneformen Bakterien. In das Identifikationssystem sollten sowohl chemotaxonomische Methoden (MS-Analyse von intakten polaren Lipiden; GC-Analyse von Fettsäuren) als auch die Sequenzierung der 16S rRNA-Gene implementiert werden. Dabei sollten die folgenden methodischen Verbesserungen für die zuverlässige Identifizierung bei gleichzeitig geringem Zeitaufwand von besonderer Bedeutung sein: 1. Kombination der separat analysierten Fettsäuren aus den Phospho- und Glykolipiden; 2. Erprobung der massenspektroskopischen Analyse der intakten polaren Lipidfraktionen und 3. Auffinden charakteristischer Regionen der 16S rRNA, die für eine Teilsequenzierung oder Entwicklung von Oligonukleotidsonden geeignet sind. Die verschiedenen Datenbanken sollten zunächst getrennt mit geeigneten multivariaten statistischen Verfahren analysiert werden, um daraufhin die Zusammenhänge zwischen den Informationssätzen aufzuzeigen. Die auf diese Weise entwickelte Methode zur hochauflösenden und schnellen Identifizierung coryneformer Bakterien sollte zum einen zur Klärung von bekannten oder im Rahmen dieser Untersuchung neu erkannten Unklarheiten in der Systematik dieser Bakteriengruppe beitragen, zum anderen die Voraussetzung für eine verlässliche Einteilung von Umweltisolaten schaffen.

Weiterhin sollten für einzelne Taxa charakteristische intakte polare Lipide identifiziert, ihre Struktur durch den kombinierten Einsatz verschiedener chromatographischer und spektroskopischer Methoden aufgeklärt und ihre chemotaxonomische Bedeutung abgeschätzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die entwickelten phylogenetischen Sonden eingesetzt werden, um die Rolle der coryneformen Bakterien an einem PCB-kontaminierten Standort zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

| | |
|---------------------------------|---|
| Autoklaven: | Tecnomara Tecnoclav 50, Sterilisatoren GmbH |
| Epifluoreszenzmikroskop: | Zeiss Axiophot |
| Analysenwaage: | BP 210 D, Sartorius, Göttingen |
| Geldokumentation: | E.A.S.Y. Sytem, Herolab |
| Gelelektrophoresekammern: | H5, BRL, Gaithersburg, USA |
| Heizplatte: | Thermoplate „S“, Dasaga |
| Klimaschränke: | Multitron und RKF-150, INFORS AG, Bottmingen, Schweiz |
| Kühlzentrifugen: | Sorvall RC3C, Sorvall RC5C, Heraeus Megafuge 2.0R |
| PCR-Thermocycler: | Perkin Elmer, Gene Amp9600 |
| pH-Meter: | pH 325/SET, WTW, Weilheim |
| Sequenzierer: | ABI PRISM System 373; Applied Biosystem |
| Spannungsgeräte: | Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia |
| Rotationsverdampfer: | Rotavapor R-114, Büchi |
| Tischzentrifuge: | Centrifuge 5417 C, Eppendorf |
| Thermoblock mit Ausblaseinheit: | Liebisch, Bielefeld |
| Ultraschallgerät: | Ultraschall Dislocator Labsonic U, B. Braun, USA |
| UV-Transilluminator: | UVP San Gabriel; CA, USA: Chromato-Vue Transilluminator |

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von der Firma Baker (Deventer, Holland) in p.a. Qualität bezogen. Es wurde HPLC-reines Methanol eingesetzt. Dichlormethan wurde vor dem Gebrauch destilliert.

Ansonsten wurden Chemikalien der Firmen Merck, Riedel de Haën, Fluka, Sigma, Baker, USB, Serva, Roth und Aldrich verwendet, sowie Medienzusätze der Firmen Difco und Oxoid. Alle für die Lipid- und Fettsäureanalytik benötigten Glasgeräte wurden mit Dichlormethan gespült, um Verunreinigungen durch eventuell vorhandene Seifenreste zu verhindern.

2.2.2 Verwendete Bakterienstämme

2.2.2.1 Typ- und Referenzstämme

Die Typ- und Referenzstämme wurden von der Culture Collection of the Laboratorium voor Mikrobiologie, Rijksuniversiteit Gent (LMG) bezogen. Die zusätzlich untersuchten Wildstämme wurden von verschiedenen Forschergruppen aus unterschiedlichen Habitaten isoliert und von der LMG verteilt.

Tab 2.1: Zusammenstellung der untersuchten Referenzstämme aus den Gattungen *Aeromicrobium* (Ae.), *Agromyces* (Ag.), *Arthrobacter* (Ar.), *Microbacterium* (Mi.), *Cellulomonas* (Ce.), *Curtobacterium* (Cu.), *Nocardioides* (No.) und *Terrabacter* (Te.).

| Spezies | Anzahl | Typ- und Referenzstämme |
|--|----------------|---|
| <i>Ae. erythreum</i> | 1 | LMG 16472 ^T (DSM 8599 ^T) ^{a, b} |
| <i>Ae. fastidiosum</i> | 1 | LMG 16205 ^T (DSM 10552 ^T) |
| <i>Ag. cerinus subsp. cerinus</i> | 3 | LMG 16155 ^T (DSM 8585 ^T), LMG 16586, LMG 16587 |
| <i>Ag. fucosus subsp. nitratus</i> | 1 | LMG 16157 ^T (DSM 8596 ^T) |
| <i>Ag. fucosus subsp. fucosus</i> | 3 | LMG 16156 ^T (DSM 8597 ^T), LMG 16588, LMG 16589 |
| <i>Ag. fucosus subsp. hippuratus</i> | 1 | LMG 16158 ^T (DSM 8598 ^T) |
| <i>Ag. ramosus</i> | 2 ^c | LMG 16680 ^T (DSM 43045 ^T) |
| <i>Ar. atrocyaneus</i> | 1 | LMG 3814 ^T (DSM 20127 ^T) |
| <i>Ar. aurescens</i> | 2 | LMG 3815 ^T (DSM 20116 ^T), LMG 16145 |
| <i>Ar. citreus</i> | 3 | LMG 16338 ^T (DSM 20133 ^T), LMG 16124, LMG 16146 |
| <i>Ar. crystallopoietes</i> | 1 | LMG 3819 ^T (DSM 20117 ^T) |
| <i>Ar. duodecadis</i> | 1 | LMG 17308 ^T (ATCC 13347 ^T) |
| <i>Ar. globiformis</i> | 4 | LMG 3813 ^T (DSM 20124 ^T), LMG 3820, LMG 16339, LMG 16340 |
| <i>Ar. histidinovorans</i> | 1 | LMG 3822 ^T (DSM 20115 ^T) |
| <i>Ar. ilicis</i> | 3 ^c | LMG 3659 ^T (DSM 20138 ^T), LMG 7255 |
| <i>Ar. mysorens</i> | 2 | LMG 16219 ^T (ATCC 33408 ^T), LMG 16125 |
| <i>Ar. nicotianae</i> | 3 | LMG 16305 ^T (DSM 20123 ^T), LMG 16126, LMG 16159 |
| <i>Ar. nicotinovorans</i> | 1 | LMG 16253 ^T (DSM 420 ^T) |
| <i>Ar. oxydans</i> | 3 | LMG 3816 ^T (DSM 20119 ^T), LMG 3817, LMG 16254 |
| <i>Ar. pascens</i> | 2 | LMG 16255 ^T (DSM 20545 ^T), LMG 16127 |
| „ <i>Ar. picolinophilus</i> “ ^d | 1 | LMG 16262 ^T (DSM 20665 ^T) |

| Spezies | Anzahl | Typ- und Referenzstämme |
|------------------------------------|--------|---|
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 3 | LMG 16679 ^T (DSM 20136 ^T), LMG 3821, LMG 16306 |
| <i>Ar. protophormiae</i> | 2 | LMG 16324 ^T (DSM 20168 ^T), LMG 16115 |
| <i>Ar. ramosus</i> | 3 | LMG 16256 ^T (DSM 20546 ^T), LMG 16185, LMG 17309 ^T |
| <i>Ar. siderocapsulatus</i> | 2 | LMG 16206 ^T (VKM-B 1122), LMG 16118 |
| <i>Ar. sulfureus</i> | 3 | LMG 16694 ^T (DSM 20136 ^T), LMG 16166, LMG 16128 |
| <i>Ar. uratoxydans</i> | 3 | LMG 16220 ^T (DSM 20647 ^T), LMG 16117, LMG 16129 |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 3 | LMG 3812 ^T (DSM 20126 ^T), LMG 16130, LMG 16257 |
| <i>Ar. viscosus</i> | 3 | LMG 16473 ^T (DSM 7307 ^T), LMG 16186, LMG 16119 |
| <i>Mi. arabinogalactanolyticum</i> | 1 | LMG 16469 ^T (DSM 8611 ^T) |
| <i>Mi. barkeri</i> | 2 | LMG 16341 ^T (DSM 20145 ^T), LMG 16142 |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> | 2 | LMG 4020 (DSM 8609 ^T), LMG 16187 |
| <i>Mi. flavescens</i> | 1 | LMG 16131 |
| <i>Mi. keratanolyticum</i> | 1 | LMG 16470 ^T (DSM 8606 ^T) |
| <i>Mi. liquefaciens</i> | 3 | LMG 16342 ^T (DSM 20638 ^T), LMG 16120, LMG 16188 |
| <i>Mi. luteolum</i> | 1 | LMG 16207 ^T (DSM 20143 ^T) |
| <i>Mi. saperdae</i> | 1 | LMG 16343 ^T (DSM 20169 ^T) |
| <i>Mi. schleiferi</i> | 2 | LMG 16153 ^T (DSM 20489 ^T), LMG 16189 |
| <i>Mi. terrae</i> | 2 | LMG 16471 ^T (DSM 8610 ^T), LMG 16190 |
| <i>Mi. terregens</i> | 2 | LMG 16258 ^T (DSM 20449 ^T), LMG 16143 |
| <i>Mi. testaceum</i> | 3 | LMG 16344 ^T (DSM 20166 ^T), LMG 16144, LMG 16237 |
| <i>Mi. trichothecenolyticum</i> | 1 | LMG 16696 ^T (DSM 8608 ^T) |
| <i>Ce. biazotea</i> | 1 | LMG 16695 ^T (DSM 20112 ^T) |
| <i>Ce. cellulasea</i> | 1 | LMG 16323 ^T (DSM 20118 ^T) |
| <i>Ce. cellulans</i> | 4 | LMG 16221 ^T (DSM 43879 ^T), LMG 16238, LMG 16259, LMG 16121 |
| <i>Ce. fimi</i> | 3 | LMG 16345 ^T (DSM 20113 ^T), LMG 16132, LMG 16239 |
| <i>Ce. flavigena</i> | 1 | LMG 16263 ^T (DSM 20109 ^T) |
| <i>Ce. gelida</i> | 2 | LMG 16697 ^T (DSM 20111 ^T), LMG 16122 |

| Spezies | Anzahl | Typ- und Referenzstämme |
|---|--------|--|
| <i>Ce. turbata</i> | 3 | LMG 4072 ^T (DSM 20577 ^T), LMG 16191, LMG 16346 |
| <i>Ce. uda</i> | 2 | LMG 16327 ^T (DSM 20107 ^T), LMG 16123 |
| <i>Cu. albibum</i> | 1 | LMG 8759 ^T (DSM 20512 ^T) |
| <i>Cu. citreum</i> | 2 | LMG 8786 ^T (DSM 20528 ^T), LMG 16240 |
| <i>Cu. flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i> | 2 | LMG 3596, LMG 7241 |
| <i>Cu. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> | 2 | LMG 3645, LMG 3650 |
| <i>Cu. flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i> | 2 | LMG 3702, LMG 3704 |
| <i>Cu. flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i> | 2 | LMG 3710, LMG 3715 |
| <i>Cu. luteum</i> | 1 | LMG 8787 ^T (DSM 20542 ^T) |
| <i>Cu. plantarum</i> | 1 | LMG 16222 ^T (DSM 7069 ^T) |
| <i>Cu. pusillum</i> | 2 | LMG 8788 ^T (DSM 20527 ^T), 8812 |
| <i>No. albus</i> | 4 | LMG 16326 ^T (DSM 43109 ^T), LMG 4080, LMG 16212, LMG 16213 |
| <i>No. jensenii</i> | 1 | LMG 16325 ^T (DSM 20641 ^T) |
| <i>No. luteus</i> | 2 | LMG 16209 ^T (DSM 43366 ^T), LMG 16160 |
| <i>No. plantarum</i> | 1 | LMG 16210 ^T (DSM 7069 ^T) |
| <i>No. simplex</i> | 3 | LMG 16261 ^T (DSM 20130 ^T), LMG 3810, LMG 16260 ^d |
| <i>T. tumescens</i> | 2 | LMG 3818 ^T (DSM 20308 ^T), LMG 16133 |

^a T=Typstamm

^b Zum besseren Vergleich mit Literaturdaten wurden bei den Typstämmen die entsprechenden Stammsammlungsnummern der DSMZ bzw. ATCC angegeben.

^c Von *Ag. ramosus* und *Ar. ilicis* wurden sowohl der Typstamm der LMG als auch der DSMZ analysiert.

^d Die Stämme "*Ar. picolinophilus*" (Koch et al., 1995a) und "*No. simplex*" LMG 16260 (Yoon et al., 1997) wurden im Laufe der vorliegenden Arbeit zu *Rhodococcus erythropolis* umgruppiert.

2.2.2.2 Isolate

Isolate von Dr. Ingrid Groth, Hans-Knöll-Institut e.V. – HKI, Jena

| | |
|-------------------------------------|---|
| Datum der Isolierung: | 1992-1996 |
| Geographische Herkunft der Isolate: | Österreich, Brasilien, Deutschland, Griechenland, Kenia, Rußland, Teneriffa |
| Habitate: | Boden, Schlamm |
| Anzahl der erhaltenen Stämme: | 38 |

Tab. 2.2: Übersicht über die untersuchten Isolate von Dr. I. Groth.

| Spezies | Anzahl | Stämme |
|------------------------------------|--------|----------------------|
| <i>Aeromicrobium sp.</i> | 1 | LMG 17246 |
| <i>Agromyces sp.</i> | 7 | LMG 17247-17253 |
| <i>Arthrobacter sp.</i> | 4 | LMG 17254-17257 |
| <i>Aureobacterium sp.</i> | 3 | LMG 17258-17260 |
| <i>Brachybacterium sp.</i> | 1 | LMG 17261 |
| <i>Brevibacterium sp.</i> | 1 | LMG 17262 |
| <i>Cellulomonas sp.</i> | 2 | LMG 17263, LMG 17264 |
| <i>Clavibacter</i> | 1 | LMG 17265 |
| <i>Curtobacterium</i> | 2 | LMG 17266, LMG 17267 |
| <i>Gordona</i> | 2 | LMG 17268, LMG 17269 |
| <i>Microbacterium</i> | 2 | LMG 17270, LMG 17271 |
| <i>Nocardioides</i> | 3 | LMG 17272-17274 |
| <i>Oerskovia</i> | 2 | LMG 17275, LMG 17276 |
| <i>Oerskovia/Promicromonaspora</i> | 3 | LMG 17277-17279 |
| <i>Promicromonaspora</i> | 2 | LMG 17280, LMG 17281 |
| <i>Pseudonocardia?</i> | 1 | LMG 17282 |
| <i>Terrabacter</i> | 1 | LMG 17283 |

Die Identifizierung der Stämme auf Gattungsebene wurde von I. Groth anhand der Kolonie- und Zellmorphologie sowie physiologischer Methoden vorgenommen. Dabei wurde das Vorhandensein bzw. die Zusammensetzung der Diaminosäuren der Zellwand, der Mycolsäuren und der Menachinone berücksichtigt (Groth et al., 1996).

Isolate von Dr. Vigdis Torsvik, Department of Microbiology and Plant Physiology, University of Bergen

| | |
|-------------------------------------|---|
| Datum der Isolierung: | 1993-1995 |
| Geographische Herkunft der Isolate: | Norwegen, Deutschland |
| Habitate: | Ackerboden, mit Klärschlamm behandelter Boden |
| Anzahl der erhaltenen Stämme: | 14 |

Die untersuchten Stämme sind in der LMG-Stammsammlung unter den Nummern LMG 17414-17429 geführt.

Diese Stämme wurden in Bergen durch Gramfärbung und Hybridisierung mit einer für Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt spezifischen Sonde (Roller et al., 1994)

charakterisiert. Einige der Stämme wurden zusätzlich mit Hilfe des BIOLOG-Systems identifiziert.

Der BIOLOG-Test stellt eine Methode zur taxonomischen Einordnung von Bakterien aufgrund ihrer stoffwechselphysiologischen Fähigkeiten (auch *metabolic fingerprinting* genannt) dar. Die bei dem Test eingesetzten Mikrotiterplatten sind mit 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen und einem Indikator-Farbstoff beschichtet. Bei Oxidation einer C-Quelle durch den zu identifizierenden Organismus wird der Indikator gleichzeitig reduziert. Diese Reaktion ist mit einem Farbumschlag verbunden. Die Auswertung des entstandenen metabolischen Musters erfolgt computergesteuert über einen Vergleich mit der bestehenden Referenzdatenbank.

Isolate von Dr. Antoon Akkermans, Department of Microbiology, Wageningen Agriculture University

Anzahl der erhaltenen Stämme: 12

Tab. 2.3: Übersicht über die untersuchten Stämme von Dr. A. Akkermans.

| Spezies | Anzahl | Stämme |
|---|--------|---|
| <i>Arthrobacter globiformis</i> | 6 | LMAU A17, LMAU A104, LMAU AC8, LMAU AC166, LMAU AC169, LMAU 206 |
| <i>Nocardioides simplex</i> | 2 | LMAU AC16, LMAU AC159 |
| <i>Terrabacter tumescens</i> | 1 | LMAU AC256 |
| <i>Arthrobacter ureafaciens</i> | 2 | LMAU AC543, LMAU AC544 |
| <i>Arthrobacter citreus</i> | 1 | LMAU AC846 |
| <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i> | 1 | LMAU C33 |
| <i>Clavibacter rathayi</i> | 1 | LMAU C37 |

Isolate von Christa Hoch, GBF, Braunschweig

Datum der Isolierung: August 1993

Geographische Herkunft der Isolate: Spittelwasser (Bitterfeld, Deutschland)

Habitat: Sediment des mit Schwermetallen und Aromaten verschmutzten Gewässers

Anzahl der erhaltenen Stämme: 7

Die Isolierung wurde auf einem Minimalmedium mit verschiedenen xenobiotischen Verbindungen als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Hierbei wurden die Substanzen 2,4-Dichloro-phenoxy-essigsäure (24D), Biphenyl (Bip), Naphthalen (Nap) und ortho-Xylen (oXy) eingesetzt. Die untersuchten Stämme sind folgendermaßen bezeichnet:

24D-01, Bip-010b, Nap-23, Nap-26a, Nap-57, oXy-07e und oXy-22.

2.2.2.3 Referenzstämme für die *in situ* Hybridisierung

Als Kontrollen der Spezifität der Sondenhybridisierungen wurden neben den coryneformen Referenzstämmen weitere Bakterienstämme ausgewählt, die sich durch sehr ähnliche Sequenzbereiche im Vergleich zu den eigentlichen Zielorganismen auszeichneten.

Tab. 2.4: Übersicht über die als Kontrollen ausgewählten Bakterienstämme.

| Gruppe | Spezies | Stamm |
|-------------------|---|------------------------|
| Gram-positiv, HGC | <i>Kocuria roseus</i> | DSM 20447 ^T |
| | <i>Micrococcus luteus</i> | DSM 20030 ^T |
| | <i>Janibacter limosus</i> | DSM 11140 ^T |
| | <i>Mycobacterium obuense</i> | DSM 44075 ^T |
| | <i>Clavibacter michiganense subsp. michiganense</i> | DSM 46364 ^T |
| | <i>Streptomyces ambofaciens</i> | DSM 40697 ^T |
| | <i>Streptomyces albus</i> | DSM 40763 ^T |
| | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | DSM 43066 ^T |
| | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> | DSM 43241 ^T |
| | <i>Propionibacterium lymphophilum</i> | DSM 4903 ^T |

2.2.3 Verwendete Medien

Die angeführten Nährmedien wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt und der pH-Wert bei Bedarf mit 1 N NaOH bzw. HCl eingestellt. Für Agarmedien wurde Difco Bacto-Agar mit einer Konzentration von 15 g l⁻¹ verwendet.

EM-Medium

| | |
|------------------|--------------|
| Trypton | 20 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Glucose | 5 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |
| pH | 7.2 bei 25°C |

Autoklavieren. Das Nährmedium wurde sowohl in flüssiger als auch in fester Form eingesetzt. Für das Flüssigmedium wurde die Glucose in 25 ml H₂O gelöst und getrennt autoklaviert.

Medium 2 L. Magadi für den Stamm *Clavibacter* sp. LMG 17265**Lösung I:**

| | |
|--|-----------|
| Glucose | 10.0 g |
| Pepton | 5.0 g |
| Hefeextrakt | 5.0 g |
| K ₂ PO ₄ | 1.0 g |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.2 g |
| H ₂ O | ad 500 ml |

Lösung II:

| | |
|---------------------------------|-----------|
| NaCl | 40.0 g |
| Na ₂ CO ₃ | 10.0 g |
| H ₂ O | ad 500 ml |

Die Lösungen I und II wurden getrennt autoklaviert und erst nach dem Abkühlen auf 60°C zusammengegeben. Das Nährmedium wurde sowohl in flüssiger als auch in fester Form eingesetzt. Bei der festen Form erfolgte die Zugabe von 15 g l⁻¹ Agar zu Lösung I.

M9-Mineralmedium (nach Sambrook et al., 1989)

Für das M9-Mineralmedium werden zusammengegeben:

| | |
|--------------------------|------------|
| 10x Mineralienlösung A | 100 ml |
| 400x Spurenelementlösung | 2.5 ml |
| Glucose | 5.0 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |

10x Mineralienstammlösung A:

| | |
|---|------------|
| Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O | 128 g |
| KH ₂ HPO ₄ | 30 g |
| NaCl | 5 g |
| NH ₄ Cl | 10 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7.0-7.2 eingestellt und autoklaviert.

400x Spurenelementlösung:

| | | |
|---|-----------|---------------------------------|
| Mineralienstammlösung B | 50 ml | |
| 1 M MgSO ₄ | 25 ml | (vor Gebrauch autoklaviert) |
| 360 mM FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 2.5 ml | (vor Gebrauch steril filtriert) |
| H ₂ O | ad 100 ml | |

Zusammensetzung der Mineralienstammlösung B:

| | |
|---|------------|
| MgO | 10.75 g |
| CaCO ₃ | 2.0 g |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 4.5 g |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 1.44 g |
| MnSO ₄ · 4 H ₂ O | 1.12 g |
| CuSO ₄ · 5 H ₂ O | 0.25 g |
| CaSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.28 g |
| H ₃ BO ₃ · 7 H ₂ O | 0.06 g |
| konz. HCl | 51.3 ml |
| H ₂ O | ad 1000 ml |

***Minimalmedium* (nach Wolfaardt et al., 1994)**

Lösung A:

| | |
|--|-----------|
| NaCl | 2 g |
| NH ₄ Cl | 1 g |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.12 g |
| Spurenelementlösung | 1 ml |
| H ₂ O | ad 400 ml |

Spurenelementlösung:

| | |
|---|--------|
| EDTA | 4 g |
| CaCl | 1.5 g |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 1 g |
| MnSO ₄ · 2 H ₂ O | 0.35 g |
| NaMoO ₄ · 2 H ₂ O | 0.5 g |

Lösung B:

| | |
|---------------------------------|-----------|
| K ₂ HPO ₄ | 5.2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2.7 g |
| H ₂ O | ad 600 ml |

Lösung A und B wurden getrennt autoklaviert und nach Abkühlen auf RT zusammengegeben.

2.2.4 Konservierung der Bakterienstämme

Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37°C inkubiert und im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt.

Für die langfristige Lagerung wurden mit einer Impföse einige Bakterienkolonien von der Agarplatte abgenommen und in 1 ml einer Mischung aus Medium und Glycerin (Endkonzentration 40 %) suspendiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und bei -70°C aufbewahrt.

2.3 Chemotaxonomische Methoden

2.3.1 Anzucht der Stämme

1 l eines Komplexmediums (EM, s. Kapitel 2.2.3) wurde mit 25 ml Vorkultur inokuliert. Die Bakterien wurden in einem 2 l Fernbach-Kolben bei 30°C und 100 rpm (GIO, GYROTORRY®, New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA) inkubiert. Die Biomasse wurde nach 72 h in der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die durch 15minütige Zentrifugation bei 16270 g erhaltene Biomasse wurden zweimal mit 10 mM Phosphatpuffer (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.0) gewaschen. Zur Kontrolle der Reinheit der angezogenen Stämme wurden die Kulturen auf Agarplatten ausgestrichen.

2.3.2 Analyse der polaren Lipide

2.3.2.1 Extraktion der intakten Lipide

Die Lipide wurden nach einer modifizierten Bligh-Dyer Methode (Bligh und Dyer, 1959) wie von Fredrickson et al., 1986 beschrieben extrahiert.

Hierbei wurden 2 g Bakterienmasse in einer Lösung aus 21.1 ml Phosphatpuffer (10mM, pH 7.0), 52.6 ml Methanol und 26.3 ml Dichlormethan (0.4:1.0:0.5, v/v/v) resuspendiert und durch eine 15minütige Ultraschall-Behandlung (Impuls-/Pausenverhältnis 0.5 W / 0.5 sec) aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dem Wechsel der Lösungsmittelverhältnisse durch die Zugabe von 57.0 ml Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.0), 35.4 ml Methanol und 61.0 ml Dichlormethan (0.9:1.0:1.0, v/v/v) und einer weiteren 5 minütigen Ultraschallbehandlung, wurden die Proben zur Phasentrennung bei 5860 g 15 min zentrifugiert. Die abgetrennte Dichlormethan-Phase wurde über getrocknetes Natriumsulfat und ein hydrophobes Silicon-Filterpapier (Whatman International Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kent, United Kingdom) abfiltriert. Ein zweiter Extraktionsschritt der wäßrigen Methanolschicht schloß sich durch Zugabe von 25 ml Dichlormethan, Zentrifugation und Filtration an. Durch die Vereinigung der beiden Dichlormethanphasen wurde die sich hier angereicherte Lipidfraktion (TL = *total lipids*) erhalten.

2.3.2.2 Auftrennung der intakten Lipide

Die anschließende Auftrennung der extrahierten TL-Fraktionen erfolgte über eine Silica-Säule (B&J EnviroPrep Silica Column; Baxter Diagnostic Inc., Burdick & Jackson Division, Muskegon, Michigan, USA). Die Säulen wurden bis zur Verwendung bei 100°C aufbewahrt. Nachdem sie auf RT abgekühlt waren, wurden sie mit 10 ml Dichlormethan konditioniert. Die Elution mit jeweils 30 ml der Lösungsmittel Dichlormethan, Aceton und Methanol ergab drei

Fraktionen unterschiedlicher Polarität: die neutralen (NL), die Glyko-(GL) und die Phospholipide (PL).

| Lösungsmittel | Eluierte Lipidfraktion |
|---------------|------------------------|
| Dichlormethan | Neutrale Lipide |
| Aceton | Glykolipide |
| Methanol | Phospholipide |

Die Eluate wurden aufgefangen und unter Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand der neutralen Lipidfraktion wurde in 1 ml Dichlormethan, die Glyko- und Phospholipidfraktionen in 1 ml Dichlormethan/Methanol (1:1) aufgenommen.

2.3.2.3 Hydrolyse und Methylierung der intakten Lipide

Die freien Fettsäuren wurden aus den Glyko- und Phospholipiden durch milde basische Hydrolyse über Nacht gewonnen. Hierzu wurden 0.25 ml der in Dichlormethan:Methanol (1:1, v/v) gelösten Glyko- und Phospholipide mit 0.5 ml 1 M Kaliumhydroxidlösung und 2.0 ml Methanol versetzt. Reaktionsrückstände wurden durch einen Extraktionsschritt mit 2 ml Hexan abgetrennt. Zu der wässrigen Phase wurden 180 µl 6 M Salzsäure, 1 ml Dichlormethan und 1 ml 10 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und unter Stickstoffstrom evaporiert. Die Methylierung wurde in 1.5 ml eines Reaktionsgemisches aus Methanol:Dichlormethan:Salzsäure (37 %) (10:1:1, v/v/v) durchgeführt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf RT wurden 1 ml Dichlormethan und 1 ml Phosphatpuffer hinzugegeben. Nach kräftigem Durchmischen (sog. *Vortexen*) wurde die organische Phase in ein GC-Probengefäß überführt. Die Extraktion wurde mit 0.5 ml Dichlormethan wiederholt und die organischen Phasen vereinigt. Das Lösungsmittel wurde evaporiert, der Rückstand in 1 ml n-Octan mit internem Standard (n-Hexadekan und n-Tetrakosan, ca. 10 ng ml⁻¹) aufgenommen.

2.3.2.4 Datenanalyse der methylierten Fettsäuren aus Glyko- und Phospholipiden

Die Auswertung der GC-Chromatogramme erfolgte über einen Vergleich der Retentionszeiten mit Standardmischungen und zuvor im Labor untersuchten Verbindungen auf der Basis von ECL-Werten (*equivalent chain length*). Aufgrund einer Konvention entspricht der ECL-Wert der Anzahl der Kohlenstoffatome der entsprechenden Fettsäure. Somit wird beispielsweise die unverzweigte Fettsäure 14:0 mit dem ECL-Wert 14.000 bezeichnet. Bei bisher unbekannten FAMES wurden GC-MS-Messungen an einem wie unter Kap. 2.4.2.1 beschriebenen Gaschromatographen mit Helium als Trägergas durchgeführt, der an ein HP 5989A Quadropol-Massenspektrometer gekoppelt war.

Die Auswertung der erstellten Datenbank der methylierten Glyko- und Phospholipide erfolgte über eine hierarchische Clusteranalyse. Die Normalisierung und Logarithmierung der Daten wurde in dem Softwareprogramm Pirouette (Infometrix, Seattle, USA) vorgenommen.

2.4 Methoden der Strukturaufklärung

2.4.1 Analyse der intakten polaren Lipide

2.4.1.1 FAB (Fast Atom Bombardement) -Massenspektrometrie

Bei der Messung eines FAB-Spektrums werden die in einer Matrix gelösten Verbindungen mit einem Strahl schneller Edelgasatome bombardiert. Polare Neutalmoleküle werden desorbiert und durch Ionenpaarbildung oder Ionen-Molekül-Reaktionen ionisiert. Die FAB-Ionisation bietet den Vorteil, daß es sich um eine "weiche" Ionisationsmethode handelt. Ein FAB-Spektrum ist daher durch ein intensives Signal von Quasi-Molekülionen und nur wenigen Fragmenten (Unterdrückung von Fragmentionen) gekennzeichnet. FAB stellt eine schnelle und einfache Methode dar und ist für die Analyse von Lipiden etabliert. Eine Quantifizierung von Substanzen ist auf diesem Wege nur schwer möglich.

Die Aufnahme der FAB-Spektren erfolgte an einem doppelfokussierenden Massenspektrometer (Finnigan MAT-95) mit einer BE-Geometrie. Die Beschleunigungsspannung betrug 5 kV, die Auflösung 1:2000. Die Quelle wurde mit einer Spannung von 19 kV betrieben, Xenon diente als FAB-Gas.

Die Detektion der Signale erfolgte computergestützt (ICIS Datensystem) durch Abtasten des Magneten von m/z 100 bis 2000 mit einer Geschwindigkeit von 3 sec dec^{-1} .

Die Messungen wurden im negativen Modus durchgeführt. Hierbei werden von allen erzeugten Ionen selektiv die negativ geladenen detektiert. Als Matrix wurde ein Gemisch aus Triethanolamin und Trimethylharnstoff im Verhältnis 2:1 (v/v) (Japanische Matrix) eingesetzt.

2.4.1.2 Tandem-Massenspektrometrie

Es wurde ein Tandem-Massenspektrometer mit vier Sektoren und einer $E_1B_1E_2B_2$ Geometrie eingesetzt (JMS-HX/HX110A, JEOL Tokyo). Die Beschleunigungsspannung betrug 10 kV, die Auflösung des ersten Massenspektrometers 1:1500, die des zweiten 1:1000. Die Quelle wurde mit einer Spannung von 6 kV betrieben. 3-Nitrobenzylalkohol diente im positiven Modus, die Japanische Matrix im negativen Modus als Matrix. Als Stoßgas wurde Helium eingesetzt.

2.4.1.3 NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren (NMR) wurden mit den folgenden Geräten gemessen:

| | |
|----------------|--|
| Bruker Am-300 | ^1H -NMR (300 MHz) und ^{13}C -NMR (75.5 MHz) |
| Bruker DPX-300 | ^1H -NMR (300 MHz) und ^{13}C -NMR (75.5 MHz) |
| Bruker WM-400 | ^1H -NMR (400 MHz) und ^{13}C -NMR (100.6 MHz) |
| Bruker DMX-600 | ^1H -NMR (600 MHz) und ^{13}C -NMR (151.1 MHz) |

Die Messungen wurden in einer Mischung aus deuteriertem Chloroform und deuteriertem Methanol (7:3) durchgeführt. Die Angabe der chemischen Verschiebung (δ) in ppm bezieht sich auf Tetramethylsilan, welches als interner Standard eingesetzt wurde.

Die Zuordnung der ^1H -NMR-Signale erfolgte anhand von (H,H)-COSY (*correlated spectroscopy*), sowie durch Vergleich der Spektren verwandter Verbindungen. Die ^{13}C -Signale wurden mittels DEPT-Spektren, (H,C)-TOCSY (*total correlated spectroscopy*) und Vergleich von strukturell ähnlichen Verbindungen zugeordnet.

2.4.1.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für eine endgültige Strukturaufklärung einer bisher unbekannten Lipidstruktur wurden die entsprechenden Fraktionen über Dünnschichtchromatographie isoliert. Für die präparative Schichtchromatographie (PSC) wurden mit Kieselgel 60F beschichtete Fertigplatten (20x20 cm) mit Konzentrierungszone und 1.00 mm Schichtdicke verwendet (Merck, Art.-Nr. 1.13895). Die Platten wurden stehend in Chromatographiekammern der Abmessungen 22 cm x 22 cm x 10 cm (Desaga, Heidelberg) entwickelt. Das Laufmittel wurde auf die jeweilig zu isolierende Verbindung abgestimmt. Die Detektion der Banden erfolgte zum einen durch ihre UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm oder durch Ansprühen eines dünnen Streifens mit Anisaldehyd und Erhitzen auf 100°C. Die auf diese Weise dokumentierten Banden wurden von der Platte abgelöst, in einen Kolben überführt und mit 4 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (1:1) extrahiert. Der Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt. Die Fraktionen wurden vereinigt und über Glaswolle filtriert, um die Probe von verbleibenden Kieselgelspuren zu befreien. Das Eluat wurde in einem Spitzkolben gesammelt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 100 μl eines Gemisches aus Dichlormethan und Methanol (1:1) aufgenommen und mit Hilfe geeigneter spektroskopischer und chromatographischer Methoden analysiert.

2.4.2 Strukturanalyse der Fettsäuren

2.4.2.1 Gaschromatographie (GC)

Die Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch (Hewlett Packard 5890 Serie II) mit einer HP Ultra 2 Kapillarsäule (50 m Länge, 0.2 mm Durchmesser, 0.11 mm Filmdicke) analysiert. Es wurde bei den Messungen ein Flammenionisations-Detektor (FID) eingesetzt und Wasserstoff diente als Trägergas. Die Injektortemperatur betrug 250°C, die Detektortemperatur 300°C. Das verwendete Temperaturprogramm sah die folgenden Schritte vor:

Die Starttemperatur von 90°C wurde 2 min gehalten, dann wurde mit 4°C min⁻¹ auf 288°C erhitzt. Es schloß sich eine 10minütige isotherme Periode an.

2.5 Molekularbiologische Techniken

2.5.1 Sequenzierung der 16S rDNA

2.5.1.1 Die Präparation der DNA

Es wurden ein bis zwei einzelne Kolonien von den Kontrollplatten der Kulturen für die Analyse der Lipide gepickt und in 100 µl TE-Puffer suspendiert. Diese Suspension wurde nach dem Vortexen 15 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde kurz bei 10000 rpm (Centrifuge 5417C, Eppendorf) zentrifugiert und 1 µl des Überstandes bei der sich anschließenden PCR-Reaktion als Template eingesetzt.

Bei einigen Isolaten konnte die DNA mit dieser schnellen Methode nicht extrahiert werden. In diesen Fällen erfolgte die DNA-Extraktion nach einer Modifikation der Methode von Wilson (1987) zur Gewinnung chromosomaler DNA aus Bakterienzellen.

Es wurde eine Bakteriensuspension in 500 µl TE-Puffer, pH 8 hergestellt. Die Proben wurden dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im kochenden Wasser wieder aufgetaut. Es erfolgte die Zugabe einer Spatelspitze Lysozym sowie 6 µl einer 1%igen RNase Lösung. Die Ansätze wurden von Hand gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 8 µl einer 1%igen Proteinase K-Lösung und 60 µl einer 10%igen SDS-Lösung hinzugegeben und weitere 30 min bei 50°C inkubiert. Jedem Ansatz wurden 100 µl 5 M NaCl und 80 µl einer vorgewärmten 10%igen CTAB-Lösung (Cetyltrimethylammoniumbromid) in 0.7 M NaCl zugesetzt. Die Proben wurden wieder gut durchmischt und 10 min bei 65°C erwärmt. Sie wurden daraufhin mit 750 µl Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) versetzt und 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Zur wäßrigen Phase wurden 350 µl Chloroform: Isoamylalkohol und 350 µl Phenol hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde die wäßrige Phase noch einmal mit 650 µl Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte

durch Zugabe von 0.6 Volumina Isopropanol zur wäßrigen Phase des letzten Extraktionsschrittes. Die durch 20 min Zentrifugation sedimentierte DNA wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde kurz getrocknet und in 50 µl TE-Puffer, pH 8 resuspendiert.

TE-Puffer

| | | Endkonzentration |
|-----------------------|-----------|------------------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8.0) | 1 ml | 10 mM |
| 0.5 M EDTA (pH 8.0) | 200 µl | 1 mM |
| H ₂ O | ad 100 ml | |

Die Stammlösungen wurden vorher autoklaviert.

2.5.1.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*), welche von Saiki und seinen Mitarbeitern 1985 entwickelt wurde, ist eine sehr einfache, aber effiziente Methode zur Amplifikation ausgewählter DNA-Segmente. Bei der Reaktion wird die denaturierte DNA zusammen mit zwei Oligonukleotiden, die als Primer dienen, und den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) inkubiert. Die Oligonukleotide sind typischerweise so konstruiert, daß ihre Sequenzen zu dem 5' bzw. 3'-Ende der Template-DNA komplementär sind und somit das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren.

Zu Beginn der PCR werden die beiden Stränge der Duplex-DNA durch Hitzedenaturierung getrennt. Im zweiten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur abgekühlt, die eine Bindung der Primer an die Template-DNA ermöglicht (sog. Primer Annealing). Anschließend erfolgt die Synthese der komplementären Stränge mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988). Der Zyklus von Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese wird viele Male durchlaufen, so daß eine exponentielle Vermehrung ausgewählter DNA-Segmente stattfindet.

Standardreaktionsansatz:

| Volumen pro Reaktion | Reagenz | Endkonzentration |
|----------------------|----------------|--------------------------------|
| | | 100 mM Tris/HCl |
| | | 10 mM |
| 10 µl | 10x PCR Puffer | 15 mM MgCl ₂ |
| | | 500 mM KCl |
| | | 50 mM |
| | | 1 µg µl ⁻¹ Gelatine |
| | | 0.1 µg µl ⁻¹ |
| 16 µl | dNTPs | je 1.25 mM |
| | | 800 µM |
| je 5 µl | Primer | jeweils 12 µM |
| | | 0.6 µM |
| je nach Bedarf | DNA-Template | variabel |
| | | variabel |
| 0.5 µl | Taq-Polymerase | 5 U µl ⁻¹ |
| | | 2.5 U |

Bei der PCR wurden die folgenden Primer eingesetzt:

| Primer^a | Sequenz (5'---3') |
|---------------------------|--------------------------|
| 16F27 | GAGTTTGATCMTGGCTCAG |
| 16R1492 | TACGGC/TTACCTTGTTACGACTT |

^a Lane et al., 1991

Die PCR wurde in einem programmierbaren GenAmp 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt:

| Vorgang | Temperatur | Zeit |
|------------------|-------------------|-------------|
| Denaturierung | 94°C | 60 sec |
| Primer Annealing | 55°C | 60 sec |
| Elongation | 72°C | 120 sec |

Von der Reaktionsfolge wurden 30 Zyklen durchlaufen, bevor die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C aufbewahrt wurden.

2.5.1.3 Detektion und Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung wurde das PCR-Produkt auf einem horizontalen Agarosegel aufgetrennt. Es wurde eine Agarosekonzentration (FMC Seakem LE) von 1% (w/v) verwendet. Die Proben wurden mit den folgenden Reagenzien versetzt

| Volumen | Reagenz |
|----------------|--------------------|
| 5 µl | MQ(Milli-Q)-Wasser |
| 2 µl | Probenpuffer |
| 3 µl | PCR-Produkt |

und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA wurde mit 1x TAE als Elektrophoresepuffer und einer konstanten Spannung von 10 V cm⁻¹ durchgeführt. Nach Abschluß der Gelelektrophorese wurden die Gele für 15-30 min in einer wäßrigen Ethidiumbromidlösung (2 µg µl⁻¹) angefärbt und anschließend mit dest. H₂O entfärbt (ca. 15 min). Ethidiumbromid interkaliert zwischen benachbarte Basenpaare und ermöglicht durch eine intensive orangefarbene Fluoreszenz die Detektion der DNA bei einer Wellenlänge von 302 nm. Die Auswertung der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des Enhanced-Analysis-Systems (Herolab, Wiesloch). Als DNA-Größenstandard wurden auf jedem Gel 700 ng einer 1 kb-Leiter (Gibco, Eggenstein) aufgetragen.

5x Ladepuffer

| | | Endkonzentration |
|------------------|-------|-------------------------|
| Bromphenolblau | 25 mg | 0.25 % (w/v) |
| Xylencyanol FF | 25 mg | 0.25 % (w/v) |
| Glycerol | 5 ml | 50 % (v/v) |
| 50x TAE | 1 ml | 5x |
| H ₂ O | 4 ml | |

50x TAE

| | | Endkonzentration |
|---------------------|------------|-------------------------|
| Tris-Base | 242 g | 0.04 M Tris-Acetat |
| Essigsäure (99.8 %) | 57.1 ml | |
| 0.5 M EDTA (pH 8.0) | 100 ml | 0.001 M EDTA |
| H ₂ O | ad 1000 ml | |

Für die Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit Hilfe von Microcon-100 Membranfiltern (Amicon, Witten) folgendermaßen aufgereinigt:

- Die PCR-Produkte wurden auf die Membranfilter aufgetragen. Nach der Zugabe von 400 µl sterilem MQ-Wasser wurde 8 min bei 3000 g zentrifugiert.
- Das Filtrat wurde verworfen. Nach erneuter Zugabe von 500 µl sterilem MQ-Wasser wurde noch einmal 8 min bei 3000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt.
- Der Filter wurde umgedreht und so in das Eppendorf-Gefäß positioniert. Bei der anschließenden 3 minütigen Zentrifugation bei 1000 g wurde das gereinigte PCR-Produkt erhalten.
- Unter Berücksichtigung der beobachteten Bandenstärke bei der vorangegangenen Gelelektrophorese wurden zu den Proben 30-100 µl steriles MQ-Wasser hinzugegeben.

2.5.1.4 DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der durchgeführten DNA-Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruch-Methode, welche von Sanger und Coulson (1977) entwickelt wurde. Hierbei ermittelt man die DNA-Sequenzen durch die kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Replikation. Eine moderne Variante dieser früher radioaktiv durchgeführten Methode stellt die computergestützte DNA-Sequenzierung dar, bei der die als Terminatoren wirkenden ddNTPs fluoreszenzmarkiert sind (Prober et al., 1987; Lee et al., 1992). Dadurch werden die DNA-Fragmente erst beim Kettenabbruch durch den Einbau der ddNTPs fluoreszenzmarkiert. Während der gelelektrophoretischen Auftrennung der Stränge, bei der dünne denaturierende Polyacrylamidgele eingesetzt werden, wird im unteren Bereich des Gels die Fluoreszenz der

jeweils eingebauten Farbstoffe durch einen langwelligen Laserstrahl angeregt und die Emission der jeweiligen Bande automatisch registriert und gespeichert.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit Hilfe des "Ready Reaction DyeDeoxy-Terminator-Cycle-Kits, FS Kit" (ABI, Weiterstadt) durchgeführt.

| Volumen pro Reaktion | Reagenz |
|----------------------|------------------------|
| 3 µl | verdünntes PCR-Produkt |
| 2 µl | Primer (10 pmol) |
| 4 µl | Premix |
| 1 µl | DMSO |
| 10 µl (ad 20 µl) | H ₂ O |

Zusammensetzung des Premix:

| Volumen pro Reaktion | Komponente | Endkonzentration |
|----------------------|---|---|
| 1.65 µl | 5x TACS-Puffer | 34 mM Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl ₂ , 42 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| 0.43 µl | dNTP-Mix | |
| 0.43 µl | DyeDeoxy A | |
| 0.43 µl | DyeDeoxy T | |
| 0.43 µl | DyeDeoxy G | |
| 0.43 µl | DyeDeoxy C | |
| 0.2 µl | <i>ampliTa^q</i> ® DNA Polymerase | |

Bei den Sequenzierungsreaktionen wurden die folgenden Primer eingesetzt:

| Primer ^a | Sequenz (5'---3') |
|---------------------|-----------------------|
| 16R518 | CGTATTACCGCGGCTGCTGG |
| 16R1087 | CTCGTTGCGGGACTTAACCC |
| 16RR1395 | TGACGGGCGGTGTGTGCTTG |
| 16F357 | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG |
| 16F945 | GGGCCCCGACAAGCGGTGG |
| 16F1103 | TGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC |

^aLane et al., 1991

Die Sequenzierungsreaktion (25 Zyklen) erfolgte in einem GenAmp 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit dem folgenden Temperaturprogramm:

| Vorgang | Temperatur | Zeit |
|------------------|------------|---------|
| Denaturierung | 96°C | 15 sec |
| Primer Annealing | 60°C | 15 sec |
| DNA-Synthese | 60°C | 240 sec |

Nach der *Taq-Cycle*-Sequenzierungsreaktion wurde das Produkt von überschüssigen DyeTerminatoren befreit. Hierfür wurden die folgenden Reinigungsschritte durchgeführt:

- Es wurden 2.0 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2) und 50 µl einer 70%igen Ethanollösung zu den 20 µl des PCR-Ansatzes hinzugegeben.
- Es folgte eine 15-30 minütige Zentrifugation bei 15000 rpm.
- Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die gefällte DNA mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen.
- Nach Abnahme des Ethanols wurde der Niederschlag ca. 30 min bei RT oder 3 min in einer Vakuumzentrifuge (DNA Speed Vac[®] DNA 110, Savant Instruments, N. Y., USA) getrocknet.

Vorbehandlung der Glasplatten

Die Glasplatten wurden mit einem Detergenz (z.B Alconox) behandelt und mit dest. H₂O gespült. Die Nachbehandlung erfolgte mit Isopropanol p.a. (Baker, Deventer, Holland)/ H₂O (9:1). Die Platten wurden getrocknet, die Spacer aufgelegt und die Glasplatten zusammengesetzt.

Denaturierendes Polyacrylamidgel (4.5% Polyacrylamid/8M Harnstoff)

| Volumen pro Gel | Reagenz |
|--|--------------------------------------|
| 25.0 g | Harnstoff |
| 5.0 ml | 10x TBE-Puffer |
| 7.5 ml | 30%ige Acrylamidlösung |
| 19.1 ml (ad 50.0 ml) | H ₂ O |
| Gellösung filtrieren (0.2 µm) und entgasen | |
| 12.5 µl | Tetraethylendiamin (TEMED) |
| 292 µl | 10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS) |

TBE-Puffer

| | |
|--|------------|
| Tris-Base | 108 g |
| Natriumborat | 55 g |
| Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 8.3 g |
| H ₂ O | ad 1000 ml |

Um ausgefallene Kristalle zu entfernen, wurde die Lösung über einen Faltenfilter (Schleicher&Schuell) filtriert.

Nach der Zugabe des Harnstoffs wurde die Mischung leicht erwärmt, um ein vollständiges Lösen des Harnstoffs zu gewährleisten. Die Lösung wurde durch einen Filter mit einer Porengröße von 0.2 µm filtriert und entgast. Es wurden die TEMED- und die APS-Lösungen hinzugegeben und sofort zwischen die vorbereiteten Platten gegossen. Der Kamm wurde eingesetzt und das Gel 1.5 h zur Polymerisation in horizontale Lage gelegt.

30%ige Acrylamid-Lösung:

Es wurden 58 g Acrylamid (Bio-Rad, München) und 2 g Bisacrylamid (Bio-Rad) in 200 ml MQ-H₂O gelöst und durch einen 0.2 µm Filter abfiltriert. Die Lösung wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Probenauftrag und Gellauf

Die getrockneten Niederschläge der Sequenzierreaktionen wurden in 3 µl Ladepuffer (deionisiertes Formamid, 25 mM EDTA, pH 8.0) suspendiert und 2 min bei 90°C denaturiert, in ein Eisbad umgesetzt und nach weiteren 2 min kurz abzentrifugiert. Der Probenauftrag auf das 4.5%ige Polyacrylamidgel erfolgte, nachdem dies bereits eine halb- bis einstündige Elektrophorese durchlaufen hatte. Spannung und Stromwerte bei Vor- und Trennlauf wurden nur durch die Maximalwerte (2500 V, 40 mA) begrenzt, limitierender Faktor war immer die Leistung von 19 W (bei Gelen mit 48 cm Trennstrecke zwischen Auftrag und Detektion). Der Trennlauf erfolgte über einen Zeitraum von 16 h.

Die Signalverstärkung, die Analyse der Bandenmuster und die Sequenzbestimmung erfolgte im Anschluß an den Gellauf mit dem systemeigenen Programm (ABI, Weiterstadt). Die automatisch bestimmten Sequenzen wurden stets manuell kontrolliert.

Ladepuffer

Dextran-Blau (Fluka) (50 mg ml⁻¹)
25 mM EDTA (pH 8.0)
deionisiertes Formamid (Sigma)

Es wurden deionisiertes Formamid (Sigma) und 25 mM EDTA (pH 8.0), welches 50 mg ml⁻¹ Dextran Blau (Fluka) enthält, im Verhältnis 5:1 zusammengegeben.

Analyse der Sequenzdaten

Die manuell kontrollierten Sequenzdaten wurden in einen Olsen-Sequenzeditor eingelesen (G. Olsen, University of Illinois) und entsprechend der vorhandenen Referenzsequenzen der 16S rRNA bzw. 16S rRNA-Gene unter Verwendung stark konservierter bakterieller Sequenzen und der Sekundärstruktur der 16S rRNA ausgerichtet (Woese et al., 1983, Gutell et al., 1985). Die Berechnung von Sequenzähnlichkeiten und geschichtlichen Abständen zwischen Sequenzpaaren erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets PHYLIP, Version 3.51 (J. Felsenstein, University of Washington) unter Verwendung des Algorithmus von Jukes und Cantor (1969).

2.6 *In situ* Einzelzellhybridisierung

2.6.1 Zellfixierungen

Paraformaldehydfixierung (Amann et al., 1990b)

1 Impföse des jeweiligen Referenzstammes wurde in 300 µl Fixierungspuffer suspendiert und 3 h bei 4°C inkubiert. Die Fixierungslösung wurde durch Zentrifugieren (1 min, 14000 rpm) entfernt, die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen, noch einmal zentrifugiert und in 500 µl 96%igem Ethanol aufgenommen. Die Aufbewahrung des Zellmaterials erfolgte bei -20°C.

Fixierungslösung

| | | Endkonzentration |
|------------------|----------|------------------|
| Paraformaldehyd | 2.0 g | 4 % |
| 10 x PBS | 5 ml | 1x |
| 1 N NaOH | 150 µl | |
| konz. HCl | 50 µl | |
| H ₂ O | ad 50 ml | |

40 ml dest. H₂O wurden auf 55-65°C erhitzt. Es wurden 2.0 g Paraformaldehyd und 150 µl 1 N NaOH hinzugegeben. Es erfolgte die Zugabe von 5 ml 10 x PBS. Mit Hilfe von konz. HCl wurde ein pH-Wert von 7.2-7.4 eingestellt.

PBS-Puffer (10x)

| | | Endkonzentration |
|--|------------|-------------------------|
| Natriumchlorid | 76.0 g | 1.3 M |
| Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O | 12.4 g | 70 mM |
| NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O | 4.1 g | 30 mM |
| H ₂ O | ad 1000 ml | |

2.6.2 Vorbehandlung der Objektträger

Die Hybridisierungsreaktionen wurden auf Objektträgern mit jeweils sechs Feldern (Marienfeld, Deutschland) durchgeführt. Diese wurden vor Gebrauch zunächst mit einer 95%iger Ethanollösung gereinigt und dann mit Gelatine beschichtet. Hierfür wurden die Objektträger in die 70°C heiße Gelatine-Lösung getaucht und daraufhin in vertikaler Position getrocknet.

Gelatine-Lösung:

| | |
|------------------------------------|--------|
| Gelatine | 0.1 % |
| CrK(SO ₄) ₂ | 0.01 % |

Die 0.1 % Gelatine (Merck) wurde unter Erhitzen von 50 ml dH₂O gelöst. Es wurden 0.01 % CrK(SO₄)₂ (Sigma-Aldrich) hinzugefügt und die Lösung gründlich durchmischt.

2.6.3 Immobilisierung der fixierten Zellen auf Objektträgern

Es wurden 1-3 µl der Bakteriensuspension auf den Feldern der Objektträger verteilt und ca. 20 min bei 42°C getrocknet. Anschließend wurden die Zellen in einer fallenden Ethanolreihe dehydratisiert (jeweils 3 min in 50 %, 80 % und 96 % Ethanol).

2.6.4 Vorbehandlung zur Permeabilisierung von Gram-positiven Paraformaldehyd-fixierten Zellen

Für die Fixierung der coryneformen Bakterien wurde das Protokoll von Hönerlage et al. (1995) zur Permeabilisierung von hydrophoben Zellwänden Gram-positiver Bakterien leicht modifiziert.

Die auf Objektträgern immobilisierten Zellen wurden mit 100 µl einer 0.1%igen Lysozymlösung (Fluka; 1 mg [37320 U] wurden in 1 ml MQ-H₂O gelöst) überschichtet und 10 min bei RT inkubiert.

2.6.5 *In situ* Hybridisierung (Amann et al., 1995b, Hahn et al., 1992)

Die Hybridisierung fand in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre statt, um unspezifische Bindungen durch Veränderung der Konzentrationsverhältnisse im Puffer zu verhindern. Hierzu wurde ein Zelltuch mit Hybridisierungspuffer getränkt und in ein 50 ml Plastikröhrchen (Greiner, Kremsmünster, Österreich) gegeben. Das Gefäß wurde einige Minuten bei 46°C inkubiert. Auf jedes Feld des Objektträgers wurden 9 µl Hybridisierungspuffer mit dem jeweils für die Sonde abgestimmten Formamidanteil (Fluka), 1 µl der fluoreszenzmarkierten Sonde (25 ng µl⁻¹) und 1 µl DAPI-Lösung (150 ng µl⁻¹) (Zarda et al., 1997) gegeben. Der Objektträger wurde in das vorgewärmte Röhrchen überführt und 2 h bei 46°C inkubiert. Die Hybridisierungsreaktion wurde durch Spülen des Objektträgers mit Waschpuffer gestoppt. Anschließend wurde das Röhrchen 20 min im Waschpuffer bei 48°C inkubiert. Der Objektträger wurde mit dest. H₂O gespült und bei Raumtemperatur getrocknet.

Hybridisierungspuffer:

| | | Endkonzentration |
|--------------------------|------------|------------------|
| 5 M Natriumchloridlösung | 1.8 ml | 0.9 M |
| 10 % SDS | 10 µl | 0.01 % |
| 1 M Tris/HCl (pH 7.0) | 200 µl | 20 mM |
| Formamid | 2.0-4.0 ml | 20-40 % |
| 0.5 M EDTA | 100 µl | 5 mM |
| H ₂ O | ad 10 ml | |

Waschpuffer:

| | | Endkonzentration |
|--------------------------|---|------------------|
| 10 % SDS | 10 µl | 0.01 % |
| 1 M Tris/HCl (pH 7.0) | 200 µl | 20 mM |
| Formamid | 2.0-4.0 ml | 20-40 % |
| 0.5 M EDTA | 100 µl | 5 mM |
| H ₂ O | ad 10 ml | |
| 5 M Natriumchloridlösung | wird in Abhängigkeit von der Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer variiert | |

| % Formamid im Hybridisierungspuffer | NaCl [mM] | 5 M NaCl [µl] |
|-------------------------------------|-----------|---------------|
| 20 | 225 | 2150 |
| 25 | 159 | 1490 |
| 30 | 112 | 1020 |
| 35 | 80 | 700 |
| 40 | 56 | 460 |

2.6.6 Kombination von *in situ* Einzelhybridisierung mit DAPI-Färbung (Zarda et al., 1997)

Verwendete Lösungen:

DAPI-Arbeitslösung 150 ng μl^{-1} in MQ-H₂O

Zur Visualisierung der Gesamtzellzahl wurde parallel zur Einzelzellhybridisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid; Sigma, Deisenhofen) gefärbt. DAPI besitzt ein Absorptionsmaximum bei 365 nm und ein Emissionsmaximum bei 418 nm; gefärbte Zellen erscheinen blau, während unspezifische Bindungen von DAPI an Polyanionen wie Polyphosphat und Natriumlaurylsulfat zu einer Gelbfärbung der Partikel führen (Porter und Feig, 1980). Der Farbstoff bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA, womit gleichzeitig eine Verstärkung der Fluoreszenz verbunden ist (Kapucinski und Skoczylas, 1977).

Es wurde zu jeder Einzelzellhybridisierung 1 μl DAPI-Arbeitslösung pipettiert und 2 h bei 46°C inkubiert.

2.6.7 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie

Der Objektträger wurde zum Schutz vor Ausbleichungseffekten der Fluoreszenzfarbstoffe in Citifluor AF1 (Citifluor Ltd., London, UK) eingebettet, das Objekt mit einem Deckgläschen (22 x 50 mm) und Nagellack versiegelt. Die Auswertung der Hybridisierungen mit Cy3-markierten Sonden (s. Kapitel 2.6.9) erfolgte mit dem Filtersatz HQ Cy3 (AHF Analysentechnik, Freiburg, Deutschland), für die Visualisierung der unspezifischen DAPI-Signale wurde der Filtersatz 01 (Carl Zeiss, Oberkochen) verwendet, der im UV-Bereich bei 365 nm anregt. Die Hybridisierungen mit FITC-markierten (5(6)-Carboxyfluorescein-N-succinimidester) Sonden wurden mit dem Filtersatz 09 (Carl Zeiss, Oberkochen) analysiert.

Es wurden Plan-Neofluar Objektive mit 63-facher Vergrößerung eingesetzt.

2.6.8 Verwendete und entwickelte Oligonukleotid-Sonden

Die in dieser Arbeit eingesetzten und entwickelten Oligonukleotid-Sonden sind in Tab. 2.5 aufgelistet.

Tab. 2.5: Eingesetzte Oligonukleotid-Sonden: Spezifitäten, Sequenzen, Zielregionen rRNA/DNA.

| Sonde | Spezifität | Oligonukleotid-Sequenz (5'-3') | Zielregion (<i>E. coli</i> Position) ^a |
|----------------------|---|--|---|
| Eub 338 ^b | Bacteria | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | 16S, 1390-1406 |
| HGC 69a ^c | GPHGC | TATAGTTAC <u>C</u> ACCGCCGT ^e | 23S, 1901-1918 |
| NHGC ^c | Kompetitor | TATAGTTAC <u>G</u> GCCGCCGT | 23S, 1901-1918 |
| MIC 841 ^d | <i>Arthrobacter</i> / <i>Micrococcus</i> | GCGCGGAAAACGTGGAAT | 16S, 841-856 |
| MIB 756 | <i>Microbacterium</i> | CAC <u>C</u> CTTTTCGCTCCTCAG | 16S, 756-773 |
| NAUR | Kompetitor | CAC <u>G</u> CTTTTCGCTCCTCAG | 16S, 756-773 |
| CEL 1030 | <i>Cellulomonas</i> | CACCTGTAC <u>C</u> ACCGACCCTA | 16S, 1030-1050 |
| NCEL | Kompetitor | CACCTGTAT <u>T</u> ACCGACCCTA | 16S, 1030-1050 |
| CUR 844 | <i>Curtobacterium</i> | TACGACACAGAAACCGTG | 16S, 844-861 |
| AER 839 | <i>Aeromicrobium</i> | GCACGGAAACCGTGGAAGGT | 16S, 839-856 |
| TER | <i>Terrabacter</i> | TGAGACCCACACCTAGTTCC | 16S, 822-840 |

^a Numerierung nach Brosius et al., 1978^b Amann et al., 1990b^c Roller et al., 1994^d Kollöffel et al., 1997^e Die markierten Basen kennzeichnen die Positionen an denen sich die Sonde mit ihrem dazugehörigen Kompetitor unterscheiden.

2.6.9 Beschreibung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Bei den am häufigsten eingesetzten Fluorochromen handelt es sich um Derivate von Fluorescein oder Rhodamin. Obwohl diese Substanzen bei Anregung mit den geeigneten Wellenlängen intensiv fluoreszieren, treten gerade bei der Verwendung von Fluoresceinderivaten einige Probleme wie pH-Empfindlichkeit und eine schnelle Abnahme der Signalstärke auf. Dies ist auch in Anwesenheit von Reagenzien zu beobachten, die ein Ausbleichen der Signale verhindern sollen. Quantitative Analysen sind daher mit Hilfe dieser Fluorochrome problematisch. In den letzten Jahren wurden Cyaninfarbstoffe (Cy3, Cy5) entwickelt (Southwick et al., 1990), die sich durch eine hohe Signalstabilität, schmale Emissionsbanden und hohe Extinktionskoeffizienten auszeichnen (Haugland, 1996).

Die Synthese der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide erfolgte durch TIB Molbiol, Berlin.

2.7 Charakterisierung der Struktur natürlicher Biofilme

2.7.1 Beschreibung des Standortes

Bei dem Ort der Probenahme handelt es sich um die Deponie eines ehemaligen Raketenstützpunktes der Westgruppe der sowjetischen Armee im Raum Wittenberg in Sachsen-Anhalt (Abb. 2.1). Dieser Standort wurde durch auslaufende Kondensatoren stark mit polychlorierten Biphenylen (PCBs) verunreinigt. Er liegt in einem sandigen Heidegebiet, weist jedoch an einigen Stellen Tonbeimischungen auf, was nach Regenfällen zu Staunässe führt. Die gemessenen PCB-Konzentrationen erstreckten sich über einen weiten Bereich. Die bisher höchste gemessene Konzentration lag bei 28 g kg^{-1} Boden, die Mehrzahl der Proben wies Kontaminationen von $10\text{-}150 \text{ mg kg}^{-1}$ Boden auf. Das Kongeneren-Gemisch war bei allen untersuchten Proben einheitlich. Es wurden neben wenigen Penta- und Hexachlor-Kongeneren überwiegend tri- und tetrachlorierte Kongenere nachgewiesen (3% Dichlor-, 45% Trichlor-, 52% Tetrachlor- und weniger als 1% Pentachlorbiphenyle). Höher chlorierte Kongenere lagen nicht vor. Diese Zusammensetzung und die relativen Anteile der einzelnen Kongenere entsprechen der russischen PCB-Mischung Trichlordiphenyl, welche mit der technischen PCB-Mischung Aroclor 1242 übereinstimmt. Im Vergleich zu Aroclor 1242 war am Standort jedoch eine Abreicherung der mono- und dichlorierten Verbindungen festzustellen. Andere Kontaminationen wurden im Boden der Deponie nicht detektiert, auch die Schwermetallbelastungen waren gering.

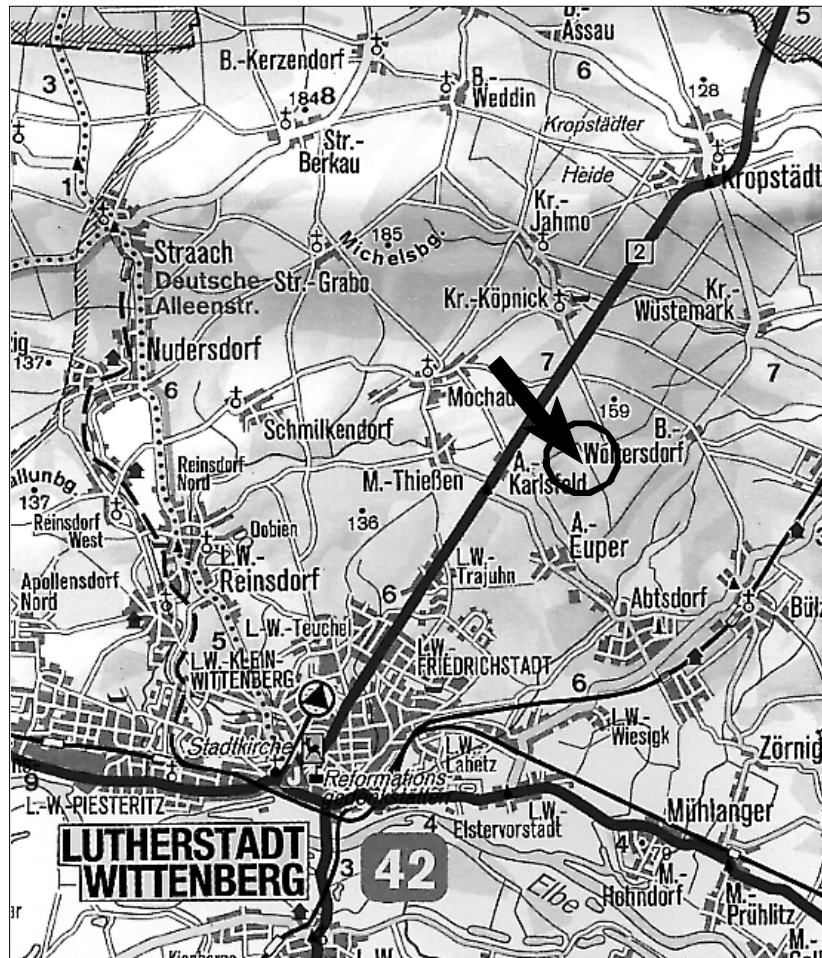


Abb. 2.1: Geographische Lage der Probenahmestelle im Landkreis Wittenberg, Sachsen-Anhalt. Der Kartenausschnitt wurde dem Falk-Plan Nr. 1483 entnommen. Der Maßstab beträgt 1:15000.

2.7.2 Probenahme

Die Bodenproben wurden an drei unterschiedlich stark PCB-belasteten Stellen des Standortes entnommen. Boden SK ist mit 3 mg PCB kg^{-1} Boden nur gering belastet, während Boden MK mit 100 mg kg^{-1} eine mittlere Konzentration aufweist und Boden HK mit 1 g kg^{-1} hoch kontaminiert ist. Die Proben wurden in sterilen Plastikbeuteln mit Wattestopfen gesammelt und bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert.

2.7.3 Bestimmung des PCB-Gehaltes im Boden

2 g Boden wurden mit $1 \mu\text{l}$ PCB 153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-Hexachlorbiphenyl; Riedel de Haen) ($10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) als internem Standard versetzt. Diese Mischung wurde dreimal mit je 5 ml Hexan ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden vereinigt und bei 40°C bei 300 mbar am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in $500 \mu\text{l}$ Hexan aufgenommen. Nach erneutem Eindampfen unter einem Stickstoffstrom wurde der Rückstand in $500 \mu\text{l}$ n-Octan

aufgenommen. Von dieser Lösung wurde 1 µl in den Gaschromatographen (HP 5890) eingespritzt.

GC-Säule: HP Ultra 2 (50 m, 0.2 mm Durchmesser, 0.11 µm Filmdicke)

Trärgas: H₂

Detektor: FID

Bei dem verwendeten Temperaturprogramm wurde die Starttemperatur von 80°C 3 min gehalten. Anschließend wurde mit 6°C pro Minute auf 288°C erhitzt. Es schloß sich eine isotherme Periode von 20 min an. Die Injektortemperatur betrug bei den Messungen 250°C, die Detektortemperatur 300°C.

Die Identifizierung der Signale erfolgte über einen Vergleich mit kommerziellen Standards und wurde durch GC-MS-Messungen verifiziert. Die Quantifizierung des PCB-Gehalts wurde wie von Nogales und Mitarbeitern beschrieben (Nogales et al., 1999) durchgeführt.

2.7.4 Konstruktion von Mehrkanaldurchflußzellen

Die Durchflußzellen wurden auf einem PMMA-Block (Lexan; General Electric RTV), in den 6 Kanäle (1 x 3 x 42 mm) hineingefräst wurden, einem Deckgläschen (Nr. 1 Dicke; Corning Glassware), und Silikonschlauch (1.5 mm Innendurchmesser; 3.18 mm Außendurchmesser; Dow Corning Co., Baxter III) gefertigt. Die Komponenten wurden mit Silikonkleber (RTV 118; G. E. Silicones, Waterford, N.Y) zusammengebaut.

2.7.5 Aufwuchs der Biofilme

Die Kultivierung natürlicher Biofilme aus den drei unterschiedlich stark belasteten Bodenproben erfolgte unter Verwendung des folgenden Versuchsaufbaus.

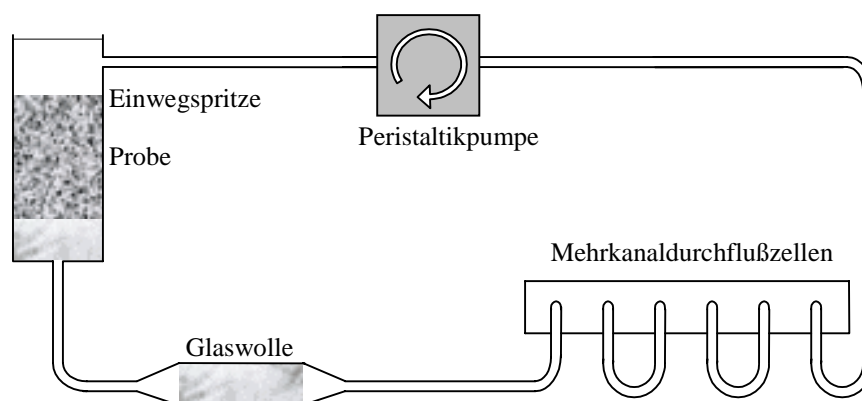


Abb. 2.2: Versuchsaufbau zur Aufzucht von Biofilmen.

Vor Versuchsbeginn wurden die Durchflußzellen mit einer 6%igen Hypochloritlösung oberflächensterilisiert, während die Schläuche und Medien durch Autoklavieren sterilisiert wurden. Um eine gleichmäßige Verteilung der PCBs und anderer Kohlenstoffquellen zu gewährleisten, wurden die Proben durch vorsichtiges Durchmischen mit einem sterilem Spatel homogenisiert und größere Wurzelstücke, Blätter und Steine entfernt. Es wurden jeweils 7 g Boden pro Versuchsansatz eingewogen und in die Einmalspritze gefüllt. Die Apparatur wurde auf sterilem Weg mit Minimalmedium befüllt, welches über eine Peristaltikpumpe (Watson Marlow 201 Z) kontinuierlich mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml h⁻¹ durch die Durchflußzelle geleitet wurde. Es wurden je zwei Versuchsansätze für die drei unterschiedlich stark kontaminierten Böden vorbereitet. Versuchsansatz 2 unterschied sich von 1 durch den Zusatz von 50 mg l⁻¹ Glucose in dem eingesetzten Minimalmedium.

2.7.6 Mikroskopische Ausstattung

Für die Untersuchung der Biofilme wurde das konfokale Laserscanning-Mikroskop MRC-600 (Bio-Rad Microscience, Mississauga, Ontario, Canada), welches mit einem Argon-Laser (Anregungswellenlänge $\lambda=488$ und 514 nm) ausgestattet und auf einem Microphot SA Mikroskop (Nikon) montiert war, verwendet. Der Aufbau und die Funktionsweise eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops wurde von Lawrence et al. (1998) detailliert beschrieben.

Die Messungen wurden mit einem 60-fach Öl-Immersions-Objektiv (Zeiss), 1.4 N.A. durchgeführt. Die Datenerfassung erfolgte mit der BioRad Steuersoftware COMOS auf einem PC.

Für die Messungen wurde die Filtersysteme A1 (Bandpaßfilter 514 DF 10, dichromatischer Spiegel DR527LP) und A2 (dichromatischer Spiegel DR565LP, Sperrfiltersets EF600 LP und 540 DF 30) eingesetzt.

2.7.7 Analyse der mikrobiellen Besiedelung der Biofilme

Für die Untersuchung der mikrobiellen Besiedelung wurde der kontinuierliche Probenfluß durch die Zelle gestoppt und eine 0.1 %ige (w/v) wäßrige Lösung von Fluorescein (Sigma) in die Zelle eingespritzt. Die vollständige interzelluläre Durchdringung des Biofilms mit dem Fluoreszenzfarbstoff bewirkte, daß alle zellfreien Regionen durch eine wellenlängenspezifische Anregung des Laserstrahles hell aufleuchteten. Die Zellen hingegen waren als dunkle Objekte erkennbar (Caldwell et al., 1992a; Caldwell et al., 1992b; Korber et al., 1992).

Zur Auswertung der Besiedelungsdichte wurden pro Meßkanal willkürlich 10 Meßpunkte direkt unterhalb des Deckgläschens ausgewählt. Die Besiedelung wurde mit Hilfe des frei nutzbaren Auswertungsprogrammes NIH-Image (National Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) auf Macintosh und der PC-Adaption ScionImage

(Scioncorp, USA; <http://www.scioncorp.com>) bestimmt. Die als Graustufen-Bitmap gespeicherten Meßergebnisse wurden durch Kontrasterhöhung in Monochrombilder umgewandelt, um Streuungseffekte und andere optische Meßartefakte vom eigentlichen Meßsignal abzutrennen. Als Wert für die Besiedelung diente der Durchschnitt der prozentualen Schwärzung des Bildes.

2.7.8 Analyse der Biofilmtiefe

Die Biofilmtiefe wurde mit Hilfe des kalibrierten Focusmotors des konfokalen Laserscanning-Mikroskops bestimmt. Es wurde die Bakterienschicht direkt unterhalb des Deckgläschens fokussiert. Anschließend wurde das Objektiv solange von der Oberfläche wegbewegt, bis sich alle Bakteriensichten außerhalb der fokussierten Ebene befanden. Diese Messung wurde an 30 zufällig ausgewählten Positionen des Biofilms vorgenommen. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der Messungen herangezogen.

2.7.9 Direkte *in situ* Hybridisierung von Biofilmen

Für die Analyse der Artendiversität der Biofilme wurden die in Kapitel 2.7.4 beschriebenen Durchflußzellen variiert. Die Abmessungen der einzelnen Kammern wurden stark verkleinert (0,5 x 1 x 10 mm), um die Menge der einzusetzenden Sonde so gering wie möglich zu halten. Zunächst wurden die Durchflußzellen von der Versuchsanordnung abgeklemmt und eine 4 % ige Formaldehydlösung zur Fixierung der Bakterien in die Kammern injiziert. Die Zellen wurden 1 h bei 4°C inkubiert. Dann wurde gründlich mit 1x PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen in einer fallenden Ethanolreihe dehydratisiert (jeweils 3 min in 50 %, 80 % und 96 % Ethanol). Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 1x PBS. Für den Nachweis Gram-positiver Bakterien wurden die Zellen nun 10 min mit einer wäßrigen LysozymbLösung (1 mg ml⁻¹) inkubiert. Wieder wurde mit 1x PBS gespült. Nach einer weiteren fallenden Ethanolreihe, wurden die Zellen mit Hybridisierungspuffer (s. Kapitel 2.6.5) äquilibriert. Es wurde 1 µl der Sonde (1000 ng µl⁻¹ bei Cy3-markierten bzw. 2000 ng µl⁻¹ bei FITC-markierten) mit 99 µl des Hybridisierungspuffers versetzt und in die einzelnen Kammern gespritzt. Die Schlauchenden wurden verschlossen und die Durchflußzellen 3 h in einem Wasserbad bei 46°C inkubiert. Der Abbruch der Hybridisierungsreaktion erfolgte durch Spülen der Kammern mit Waschpuffer. Die Zellen wurden anschließend noch einmal 20 min bei 48°C inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Kammern mit dest. H₂O gewaschen.

Die Fixierung, die Hybridisierungsreaktion und die Analyse wurden an einem Tag durchgeführt, da die Intensität der Signale sehr schnell abnahm.

2.7.10 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch konfokale Lasermikroskopie

Die Dokumentation der erhaltenen Ergebnisse erfolgte immer parallel photographisch mit Hilfe einer automatischen Kamera (Nikon DX-DB2) und dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Als Filmmaterial wurden Kodak Ektrachrome P1600 Filme (Diapositiv, Farbe) verwendet. Die am Mikroskop gewonnen Aufnahmen wurden mit dem Softwareprogramm Photoshop 5.0 (Adobe Systems Incorporated, CA, USA) weiterbearbeitet.

3. Ergebnisse

Teil I

Phylogenie und Chemotaxonomie von Referenzstämmen und Isolaten coryneformer Bakterien

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Entwicklung einer Identifizierungsstrategie für ausgewählte Gattungen der coryneformen Bakterien. Hierzu wurde das Auflösungsvermögen verschiedener chemo- und molekulartaxonomischer Methoden zunächst an Referenzstämmen evaluiert und anschließend an Isolaten verschiedener Habitate getestet. In den nachfolgenden Kapiteln werden die wichtigsten Schritte der Identifizierungsstrategie beschrieben.

3.1 Chemotaxonomische Methoden zur Charakterisierung coryneformer Bakterien

3.1.1 Gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester der polaren Lipide

Die Analyse der Zusammensetzung zellulärer Fettsäuren hat sich in der Vergangenheit zu einer Standardmethode in der bakteriellen Systematik entwickelt. Nicht zuletzt die Entwicklung des Software-Pakets MIS (Sasser, 1990), mit dem eine automatische Identifizierung von Bakterien anhand ihrer Fettsäureprofile möglich ist, förderten die kontinuierliche Vergrößerung des Anwendungsbereiches dieser Methode. Eine Reihe taxonomischer Studien zeigte (Fredrickson et al., 1986; Skerratt et al., 1991; Guckert et al., 1991; Nunes et al., 1992; Kohring et al., 1994), daß die aufgrund der Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen gefundenen Verwandtschaftsverhältnisse den phylogenetischen Zusammenhängen entsprachen und demonstrierten somit den großen Nutzen dieser schnellen und kostengünstigen Methode für die Identifizierung und Klassifizierung von Mikroorganismen. Unter diesen Voraussetzungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählte coryneforme Bakterienstämme unter standardisierten Bedingungen angezogen (EM-Medium, 30°C, Ernte in der spätexponentiellen Phase) und deren Fettsäurezusammensetzung analysiert. Hierbei wurden insgesamt die folgenden 40 verschiedenen Fettsäuren detektiert.

Tab. 3.1: Fettsäuren, die in den untersuchten Bakterienstämmen nachgewiesen wurden.

| Kurzbezeichnung | ECL ^a | Systematischer Name |
|--------------------------------|------------------|--|
| Gesättigte Fettsäuren | | |
| 12:0 | 12.000 | Dodecansäure |
| 14:0 | 14.000 | Tetradecansäure |
| 15:0 | 15.000 | Pentadecansäure |
| 16:0 | 16.000 | Hexadecansäure |
| 17:0 | 17.000 | Heptadecansäure |
| 18:0 | 18.000 | Octadecansäure |
| 19:0 | 19.000 | Nonadecansäure |
| 20:0 | 20.000 | Eicosansäure |
| 22:0 | 22.000 | Docosansäure |
| Ungesättigte Fettsäuren | | |
| 15:1 ω 6 | 14.850 | 9-Pentadecensäure |
| c16:1 ω 8i | 15.368 | 14-Methyl- <i>cis</i> -8-Pentadecensäure |
| c16:1 ω 6i | 15.464 | 14-Methyl- <i>cis</i> -10-Pentadecensäure |
| 16:1 ω 7i | 15.793 | 14-Methyl- <i>cis/trans</i> -9-Pentadecensäure |
| c17:1 ω 7i | 16.416 | 15-Methyl- <i>cis</i> -8-Hexadecensäure |
| c17:1 ω 8 | 16.788 | <i>cis</i> -10-Heptadecensäure |
| c17:1 ω 6 | 16.835 | <i>cis</i> -12-Heptadecensäure |
| c18:1 ω 8i | 17.447 | 16-Methyl- <i>cis</i> -9-Heptadecensäure |
| 18:2 ω 6,9 | 17.682 | 6,9-Octadecensäure |
| 18:1 ω 6 | 17.753 | 12-Octadecensäure |
| c18:1 ω 7 | 17.798 | <i>cis</i> -11-Octadecensäure |
| t18:1 ω 7 | 17.842 | <i>trans</i> -11-Octadecensäure |
| 19:1 ω 8 | 18.733 | 11-Nonadecensäure |
| 20:1 ω 9 | 19.743 | 11-Eicosensäure |
| 22:1 ω 9 | 21.750 | 13-Docosensäure |
| Verzweigte Fettsäuren | | |
| 14:0i | 13.590 | 12-Methyltridecansäure |
| 15:0i | 14.624 | 13-Methyltetradecansäure |
| 15:0a | 14.707 | 12-Methyltetradecansäure |
| 16:0i | 15.628 | 14-Methylpentadecansäure |
| 17:0i | 16.631 | 15-Methylhexadecansäure |
| 17:0a | 16.722 | 14-Methylhexadecansäure |
| 18:0i | 17.412 | 16-Methylheptadecansäure |
| 10-Me 18:0 | 18.376 | 10-Methyloctadecansäure (TBSA) |
| 19:0i | 18.586 | 17-Methyloctadecansäure |
| Hydroxyfettsäuren | | |
| 3-OH 11:0 | 12.355 | 3-Hydroxyundecansäure |
| 2-OH 16:0 | 17.199 | 2-Hydroxyhexadecansäure |
| Cyclopropanfettsäuren | | |
| 19:0 d8,9 | 18.871 | 8,9- <i>cis</i> -Methylenoctadecansäure |
| Unbekannte Fettsäuren | | |
| unbekannt | 16.089 | unbekannt |
| unbekannt | 16.212 | unbekannt |
| unbekannt | 18.063 | unbekannt |
| unbekannt | 18.333 | unbekannt |

^a ECL= Äquivalente Kettenlängenwerte (equivalent chain length)

3.1.2 Reproduzierbarkeit der polaren Fettsäuremethylesterprofile

Ein entscheidender Faktor zur Abschätzung des Leistungsvermögens und der Zuverlässigkeit jeder Identifizierungsmethode ist die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde mit den drei repräsentativ ausgewählten Referenzstämmen *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* LMG 16586, *Ar. histidinolorans* LMG 3822T und *Cellulomonas cellasea* LMG 16323T getestet, wie hoch die qualitative und quantitative Reproduzierbarkeit der Fettsäuremethylesteranteile bei Anzucht unter konstanten Bedingungen, aber getrennten Aufarbeitungen ist. Hierzu wurden die Stämme in acht Parallelen in je 11 EM-Flüssigmedium angezogen. Die Lipide wurden mit Hilfe der modifizierten Bligh und Dyer Methode extrahiert, anschließend die abgetrennten Glyko- und Phospholipide verseift und methyliert. Die erhaltenen Fettsäuremuster wurden unter Berücksichtigung sowohl ihrer qualitativen als auch quantitativen Zusammensetzung durch Berechnung der Euklidischen Distanzen miteinander verglichen. Aus der resultierenden Matrix wurden die Ähnlichkeiten der Mehrfachbestimmungen berechnet. Die erhaltenen Werte stellen ein gemeinsames Maß für die "biologische" Reproduzierbarkeit der Fettsäuremuster und deren Analytik dar.

Tab. 3.2: Reproduzierbarkeit der Fettsäuremethylesterprofile der Phospho- (PL) und Glykolipidfraktionen (GL).

| Probe | Mittlere Ähnlichkeit [%] | Standardabweichung |
|--|--------------------------|--------------------|
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> LMG 16586 (PL) | 89.0 | 1.9 |
| <i>Ar. histidinolorans</i> LMG 3822T (PL) | 88.2 | 4.6 |
| <i>Ce. cellasea</i> LMG 16323T (PL) | 86.4 | 6.4 |
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> LMG 16586 (GL) | 90.0 | 4.9 |
| <i>Ar. histidinolorans</i> LMG 3822T (GL) | 88.7 | 4.1 |
| <i>Ce. cellasea</i> LMG 16323T (GL) | 84.8 | 4.5 |

Zusätzlich wurden die Variationskoeffizienten (Standardabweichung/Mittelwert) x 100 für jede Fettsäure mit einem prozentualen Anteil von >4% berechnet. Die ermittelten Koeffizienten erreichten bei einzelnen Fettsäuren Werte von bis zu 30%.

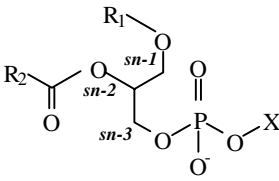
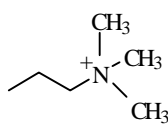
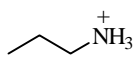
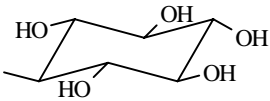
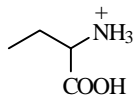
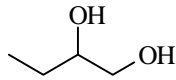
3.1.3 Fast-Atom-Bombardement (FAB)-Massenspektrometrie zur Analyse der intakten polaren Lipide

Die polaren Lipide werden in Abhängigkeit ihrer polaren Komponente in zwei Hauptklassen eingeteilt, namentlich in die Phospho- und die Glykolipide. Beide enthalten zusätzlich Fettsäuren, so daß die Moleküle sowohl hydrophile als auch hydrophobe Komponenten besitzen und somit zu den amphipatischen Verbindungen gehören.

Phospholipide stellen die Grundbausteine der Cytoplasmamembran dar. Sie bilden dort eine Doppellipidschicht, in die zahlreiche Proteine und die Komponenten der Atmungskette eingebettet sind. Phospholipide sind durch ihre ungewöhnlichen Eigenschaften in der Lage, Biochemikalien in der Zellmembran zu konzentrieren und die Zelle auf diese Weise vor ihrer

Umgebung zu schützen. Grundsätzlich unterscheidet man bei den Phospholipiden zwei Strukturklassen: (1) Sphingolipide leiten sich von dem komplexen Alkohol Sphingosin ab und treten in Form von Sphingomyelin vor allem in eukaryotischen Zellmembranen auf sowie (2) Phosphoglyceride, die sich von dem dreiwertigen Alkohol Glycerin ableiten. Sie bestehen aus einem Glycerinrückgrat, zwei Fettsäureketten und einem phosphorylierten Alkohol. Sie sind in Eukaryoten und Prokaryoten abundant. Die verschiedenen Phosphoglyceridtypen entstehen durch Veresterung der Phosphorylgruppe mit Alkoholen. Die Benennung erfolgt nach der Natur der Alkoholkomponente.

Tab. 3.3: Strukturformeln der häufigsten Phosphoglyceride.

| Grundstruktur | X | Phospholipidtyp |
|--|---|------------------------------|
|  |  | Phosphatidylcholin (PC) |
| |  | Phosphatidylethanolamin (PE) |
| |  | Phosphatidylinositol (PI) |
| |  | Phosphatidylserin (PS) |
| |  | Phosphatidylglycerin (PG) |

Neben diesen häufigsten Phosphoglyceriden wurden in Mikroorganismen weitere ungewöhnliche Phospholipidtypen beobachtet. So unterscheiden sich z. B. die Archaeobakterien von anderen Prokaryoten durch das Vorkommen von Dietherphospholipiden, bei denen langkettige Alkohole durch Etherbindungen mit dem GlycerinGrundgerüst verbunden sind.

Glykolipide sind zuckerhaltige Lipide. In bakteriellen Zellen leiten sie sich wie die Phospholipide vom Glycerin ab.

Bisher erfolgte die Analyse der polaren Lipide überwiegend durch ein- oder zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (DC). Die erhaltenen Informationen beschränken sich bei dieser Methode aber tatsächlich auf den Typ des polaren Lipides. Einen weitaus höheren Informationsgehalt liefert dagegen die Analyse der intakten polaren Lipide

mit Hilfe massenspektroskopischer Methoden. Die MS-Spektren können als Fingerprints dienen und somit eine schnelle Unterscheidung einzelner Stämme ermöglichen. Bei den hier beschriebenen Messungen wurde FAB als Ionisierungsart ausgewählt. Hierbei wird die Probe in einer Matrix gelöst und auf einen Träger aufgebracht. Dieser wird mit einem Strahl schneller, neutraler Atome (typischerweise Argon oder Xenon) beschossen, wodurch neben sogenannten Pseudomolekülonen Fragmentationen geringer Masse gebildet werden. Bei der Messung der positiven Ionen werden üblicherweise $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ -Ionen, bei Messung der negativen Ionen $[M+H]^-$ -Ionen gebildet.

Die gewählte Ionisierungsart wurde von Clay und Mitarbeitern (1983) als geeignete Methode zur Analyse intakter polarer Lipide erkannt. Die Gründe hierfür sind vor allem in dem besonderen chemischen Verhalten dieser Verbindungsklasse zu finden, die zum einen eine stark lipophile Region aufweisen, die den Molekülen die Orientierung zur Oberfläche der FAB-Matrix erlaubt und zum anderen polare Funktionalitäten besitzen, die positive oder negative Ladungen in der Gasphase annehmen können. Eine genauere Charakterisierung des jeweiligen Phospholipidtyps, d.h. die Bestimmung der Struktur und Position der einzelnen Fettsäuren, kann zuverlässig auch bei komplexen Lipidmischungen durch die Tandem-Massenspektrometrie erfolgen.

3.1.4 Reproduzierbarkeit der polaren Lipidprofile

Analog dem unter Kapitel 3.1.2 beschriebenen Verfahren wurde auch die Reproduzierbarkeit der polaren Lipidprofile bestimmt. Die in Tab. 3.4 zusammengestellten Ergebnisse zeigten, daß zwischen getrennt aufgearbeiteten und analysierten Proben relativ große Unterschiede bestanden.

Tab. 3.4: Reproduzierbarkeit der intakten Phospholipidprofile (PL).

| Probe | Mittlere Ähnlichkeit [%] | Standardabweichung |
|--|--------------------------|--------------------|
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> LMG 16586 (PL) | 82.9 | 6.2 |
| <i>Ar. histidinovorans</i> LMG 3822T (PL) | 76.0 | 4.7 |
| <i>Ce. cellasea</i> LMG 16323T (PL) | 72.1 | 3.4 |

3.2 Die Gattung *Arthrobacter*

Die Gattung *Arthrobacter* umfaßt derzeit 29 gültig beschriebene Arten. Hiervon wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 22 Arten vertreten durch 29 Stämme polyphasisch analysiert. Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit der verschiedenen Datensätze zu erreichen und die Aussagen über die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Arthrobacter* auf eine breite Basis zu stellen, wurden die 16S rDNA-Sequenzen der Typstämme von *Ar. duodecadis* und *Ar. mysorens* bestimmt. Die Sequenzen der anderen Typstämme konnten aus allgemein zugänglichen Datenbanken heruntergeladen werden. In die Studie wurde zusätzlich der ATCC-Typstamm von *Ar. ramosus* (ATCC 13727 = LMG 17309) miteinbezogen, da vorhergehende Untersuchungen (Koch et al., 1994) eine 100%ige Sequenzübereinstimmung der Stämme *Ar. pascens* (DSM 20545T) und *Ar. ramosus* (DSM 20546T) ergeben hatten. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf eine Vertauschung der beiden Stämme zurückzuführen.

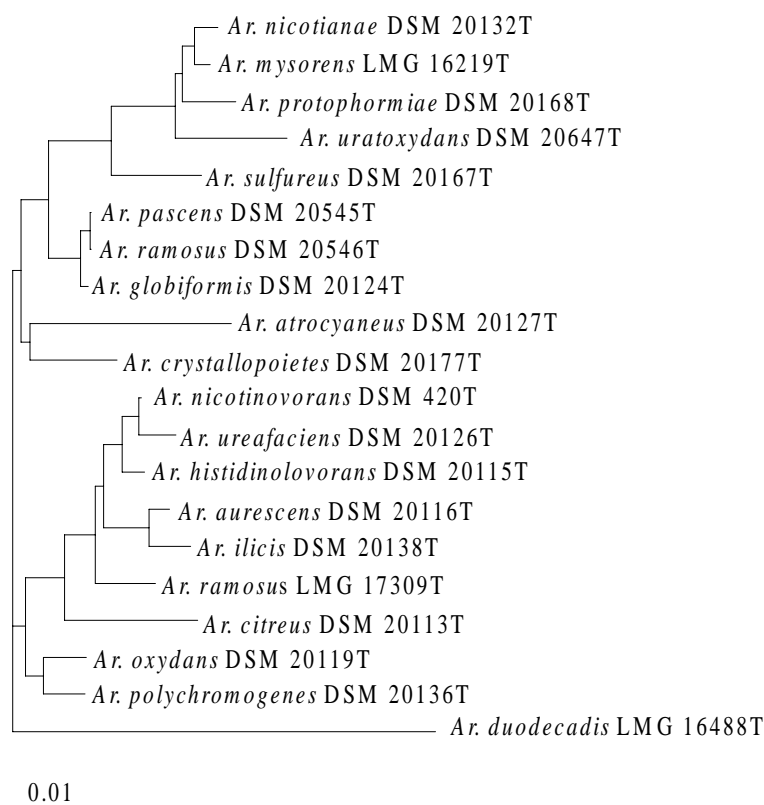


Abb. 3.1: Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf dem Vergleich der nahezu vollständigen 16S rRNA-Sequenzen der analysierten Typstämme der Gattung *Arthrobacter*. Die Sequenzunterschiede wurden mit dem Algorithmus von Jukes und Cantor (1969) in evolutionäre Unterschiede umgerechnet und daraus mit dem Algorithmus von Fitch und Margolish (1967) ein Dendrogramm erstellt. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 1%.

Tab. 3.5: 16S rRNA-Sequenzähnlichkeiten zwischen den Typstämmen der analysierten *Arthrobacter*-Spezies. Bei der Berechnung wurde das nahezu vollständig sequenzierte 16S rRNA-Gen einschließlich der hypervariablen Regionen berücksichtigt.

| Organismen | 16S rRNA-Sequenzähnlichkeiten | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------|
| | <i>Ar. globiformis</i> | <i>Ar. atrocyaneus</i> | <i>Ar. aurescens</i> | <i>Ar. citreus</i> | <i>Ar. crystallopoites</i> | <i>Ar. duodecadis</i> | <i>Ar. histidinolorans</i> | <i>Ar. ilicis</i> | <i>Ar. mysorens</i> | <i>Ar. nicotianae</i> | <i>Ar. nicotinovorans</i> | <i>Ar. oxydans</i> | <i>Ar. pascens</i> | <i>Ar. polychromogenes</i> | <i>Ar. protophormiae</i> | <i>Ar. ramosus^a</i> | <i>Ar. ramosus^b</i> | <i>Ar. sulfureus</i> | <i>Ar. uratoxydans</i> |
| <i>Ar. atrocyaneus</i> | 94.4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. aurescens</i> | 95.7 | 93.7 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. citreus</i> | 95.2 | 93.5 | 96.0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. crystallopoites</i> | 97.7 | 94.7 | 95.8 | 96.3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. duodecadis</i> | 92.1 | 90.4 | 92.0 | 91.6 | 92.5 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. histidinolorans</i> | 96.2 | 94.1 | 98.3 | 95.9 | 95.9 | 91.8 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. ilicis</i> | 97.7 | 93.7 | 98.6 | 96.3 | 95.1 | 91.4 | 95.9 | | | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. mysorens</i> | 96.3 | 93.8 | 94.7 | 93.3 | 95.4 | 91.5 | 94.3 | 98.3 | | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. nicotianae</i> | 96.4 | 94.0 | 94.4 | 93.3 | 95.6 | 91.6 | 94.6 | 93.7 | 99.3 | | | | | | | | | | |
| <i>Ar. nicotinovorans</i> | 96.2 | 94.1 | 98.2 | 96.0 | 96.0 | 91.7 | 99.4 | 98.0 | 94.4 | 94.7 | | | | | | | | | |
| <i>Ar. oxydans</i> | 97.3 | 93.4 | 96.4 | 95.4 | 95.9 | 92.2 | 96.8 | 95.7 | 94.9 | 95.1 | 96.9 | | | | | | | | |
| <i>Ar. pascens</i> | 99.2 | 94.5 | 96.1 | 94.9 | 97.2 | 91.9 | 96.6 | 95.4 | 96.7 | 96.9 | 96.7 | 97.5 | | | | | | | |
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 97.0 | 93.4 | 96.5 | 95.6 | 95.7 | 92.5 | 97.0 | 95.8 | 95.1 | 95.3 | 97.1 | 98.7 | 97.2 | | | | | | |
| <i>Ar. protophormiae</i> | 96.1 | 93.4 | 94.8 | 93.2 | 95.3 | 91.2 | 94.4 | 94.3 | 98.8 | 98.3 | 94.5 | 94.6 | 96.5 | 94.7 | | | | | |
| <i>Ar. ramosus^a</i> | 99.3 | 94.4 | 96.1 | 94.1 | 97.1 | 91.9 | 96.6 | 95.4 | 96.5 | 96.8 | 96.7 | 97.5 | 99.8 | 97.2 | 96.4 | | | | |
| <i>Ar. ramosus^b</i> | 96.4 | 93.6 | 97.7 | 95.8 | 95.7 | 91.8 | 97.9 | 97.5 | 94.2 | 94.2 | 97.9 | 96.7 | 96.0 | 97.0 | 94.4 | 96.0 | | | |
| <i>Ar. sulfureus</i> | 96.8 | 92.9 | 94.7 | 94.8 | 96.0 | 91.1 | 94.4 | 93.9 | 96.6 | 96.2 | 94.5 | 94.9 | 96.2 | 95.1 | 96.1 | 94.4 | 94.9 | | |
| <i>Ar. uratoxydans</i> | 95.4 | 93.1 | 93.5 | 94.7 | 94.7 | 90.5 | 93.4 | 92.8 | 97.4 | 97.6 | 95.5 | 94.1 | 95.4 | 94.6 | 96.8 | 95.3 | 93.8 | 95.6 | |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 95.8 | 93.7 | 96.5 | 95.2 | 95.7 | 90.7 | 97.7 | 96.4 | 92.9 | 93.1 | 98.1 | 95.8 | 95.4 | 95.9 | 93.0 | 95.4 | 97.4 | 93.6 | 92.7 |

^a *Arthrobacter ramosus* DSM 20546T

^b *Arthrobacter ramosus* LMG 17309T

Wie aus dem phylogenetischen Stammbaum und den dazugehörigen Sequenzähnlichkeiten hervorgeht, teilt sich die Gattung *Arthrobacter* aufgrund der Zusammensetzung ihrer 16S rDNA in verschiedene Gruppen auf. Ein eng verwandtes Paar bilden *Ar. globiformis* DSM 20124T mit den beiden identischen Sequenzen der DSM-Typstämme von *Ar. ramosus* und *Ar. pascens* (99% Sequenzähnlichkeit). Ein weiteres Paar stellen die Stämme *Ar. mysorens* LMG 16129T und *Ar. nicotianae* DSM 20132T (99.3%) dar. Diese sind mit den Stämmen *Ar. protophormiae* DSM 20168T und *Ar. uratoxydans* DSM 20647T assoziiert. Zwischen den Stämmen besteht eine Sequenzähnlichkeit von ca. 98.5%. Etwas weiter entfernt verwandt mit dieser Gruppe ist *Ar. sulfureus* DSM 20167T (96% Ähnlichkeit). Von dieser Großgruppe abgetrennt ist eine weitere Gruppierung von *Arthrobacter*-Arten festzustellen. Hierbei bilden *Ar. nicotinovorans* DSM 420T, *Ar. ureafaciens* DSM 20126T und *Ar. histidinolovorans* DSM 20115T eine Einheit mit Sequenzähnlichkeiten von ca. 98%. Ein Paar bilden *Ar. aurescens* DSM 20116T und *Ar. ilicis* DSM 20138T (Sequenzähnlichkeit 98.5%). *Ar. ramosus* LMG 17309T und *Ar. citreus* DSM 20113T sind mit diesen Organismen verbunden, bilden jedoch eigene Zweige. Ein anderes Paar stellen *Ar. oxydans* DSM 20119T und *Ar. polychromogenes* DSM 20136T dar, die eine Sequenzähnlichkeit von 99% verbindet.

Abgetrennt von den anderen *Arthrobacter*-Arten bilden *Ar. atrocyaneus* und *Ar. crystallopoietes* jeweils eigene Zweige im phylogenetischen Stammbaum.

Die geringen Sequenzähnlichkeiten von *Ar. duodecadis* LMG 16488T zu den anderen Vertretern der Gattung *Arthrobacter* geben deutliche Hinweise darauf, daß dieser Stamm bislang falsch identifiziert wurde. Dieser Stamm zeigte mit 96% die größte Ähnlichkeit zu dem Actinomyceten *Janibacter limosus* (Martin et al., 1997). Keine Berücksichtigung bei der phylogenetischen Analyse fand der Stamm "*Ar. picolinophilus*", da dieser von Koch et al. (1995) zu *Rhodococcus erythropolis* reklassifiziert wurde.

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipide

Die Ergebnisse der Analyse der Fettsäuren aus Phospho- und Glykolipiden sind in den Tabellen 3.6 und 3.7 sowie graphisch als Dendrogramm (Abb. 3.2) dargestellt. Die überwiegende Anzahl der Stämme zeichnete sich in beiden polaren Lipidfraktionen durch ein qualitativ einheitliches Muster aus. Es wurden überwiegend gesättigte unverzweigte und verzweigte Fettsäuren detektiert (15:0i (0-27%), 15:0a (13-75%), 16:0i (<8%), 16:0 (1-37%), 17:0i (<7%), 17:0a (4-37%)). Eine weitere Differenzierung der Gattung *Arthrobacter* bis hin zur Artebene war jedoch problematisch, wie insbesondere die Clusteranalyse verdeutlicht. Dies ist vor allem auf die teilweise erheblichen Abweichungen zwischen verschiedenen Stämmen einer Art zurückzuführen. Individuelle stammspezifische Variationen verhinderten somit eine Gruppierung der einzelnen Arten. Um die quantitativen Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung besser bewerten zu können, wurde die 16S rDNA besonders auffälliger Vertreter partiell sequenziert. Dies gilt z.B. für die Art *Ar. globiformis*, bei der sich zwei Stämme bezüglich der Fettsäurezusammensetzung sehr deutlich vom Typstamm

unterschieden. Hierbei konnte die Abweichung durch Sequenzierung bestätigt werden. *Ar. globiformis* LMG 16339 zeigte die höchste Ähnlichkeit zu *Ar. ilicis* DSM 20138T (98.3%), während *Ar. globiformis* LMG 3820 eine identische Sequenz zu *Corynebacterium variabilis* DSM 20132T aufwies. So konnte auch in den Fällen von *Ar. ilicis* LMG 7255 und *Ar. oxydans* LMG 3817 das abweichende Fettsäureprofil auf Fehlidentifizierungen zurückgeführt werden. *Ar. ilicis* ist durch Sequenzähnlichkeiten von 98.9% zu *Curtobacterium luteum* DSM 20542T gekennzeichnet, *Ar. oxydans* weist eine Ähnlichkeit von 99.5% zu *Ar. histidinovorans* DSM 20115T auf. Die Sequenzierungsergebnisse des Stammes *Ar. duodecadis* LMG 16488T spiegeln sich auch in der stark differierenden Fettsäurezusammensetzung wider. Auch Keddie und Cure hatten schon 1977 im Rahmen ihrer Untersuchungen bei diesem Stamm abweichende Zellwandkomponenten im Vergleich zu anderen *Arthrobacter*-Spezies festgestellt.

Zusammensetzung der intakten polaren Lipide

Da ein erstes Screening der analysierten coryneformen Stämme eine größere strukturelle Vielfalt der Phospholipide im Vergleich zu den Glykolipiden ergeben hatte, wurde die elektronische Datenerfassung auf diese Gruppe beschränkt. Tab. 3.8 sind die prozentualen Anteile der massenspektroskopisch analysierten intakten Phospholipide der analysierten *Arthrobacter*-Stämme zu entnehmen. Alle Spektren waren durch ein einfaches Muster aus Phosphatidylglycerinen und Cardiolipinen gekennzeichnet. Die höchsten Signalintensitäten wurden bei $m/z=694$ und 722 gemessen. Die Verschiebung des Hauptpeaks zu einer dieser Massen war der auffälligste Unterschied zwischen den einzelnen Spektren. Insgesamt genügten diese Abweichungen zur Ausbildung artspezifischer Profile jedoch nicht aus.

Tab. 3.6: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen der analysierten *Arthrobacter*-Arten.^a

| Spezies | LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1 ω 8i | 18:2 ω 6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1 ω 8 | 19:0 |
|-----------------------------|---------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------------------|-------------------|------|------|------|------------|-----------------|------|
| <i>Ar. atrocyaneus</i> | 3814T | tr ^c | tr | 9.5 | 39.0 | tr | 5.1 | tr | 1.9 | 4.8 | 36.9 | tr | - | - | tr | 1.4 | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. aurescens</i> | 16145 | tr | tr | 4.0 | 36.8 | - | tr | - | 2.5 | 4.4 | 13.3 | tr | - | - | tr | - | 10.0 | - | 7.0 | 2.1 |
| <i>Ar. aurescens</i> | 3815T | - ^d | - | 3.9 | 43.9 | - | 3.3 | - | 4.5 | 4.1 | 31.9 | - | - | - | tr | - | 1.5 | - | 1.9 | 2.3 |
| <i>Ar. citreus</i> | 16124 | - | tr | 3.2 | 71.1 | - | 2.1 | - | 1.5 | tr | 21.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. citreus</i> | 16146 | tr | 1.1 | 3.6 | 74.6 | - | 2.1 | - | 5.7 | tr | 9.9 | - | - | - | tr | - | tr | - | - | - |
| <i>Ar. citreus</i> | 16338T | - | - | - | 30.8 | - | - | - | 4.6 | - | 64.7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. crystallopoietes</i> | 3819T | - | - | 7.9 | 65.5 | - | 1.8 | - | 4.7 | 2.3 | 17.7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. duodecadis</i> | 16468T | tr | tr | 10.7 | 1.6 | tr | 7.3 | tr | 7.1 | 5.2 | 4.1 | 8.2 | 5.3 | - | 11.0 | - | 15.4 | 13.3 | 1.7 | tr |
| <i>Ar. globiformis</i> | 16339 | - | - | - | 28.8 | - | - | - | 4.0 | 7.4 | 54.5 | - | - | - | - | tr | - | - | 5.4 | - |
| <i>Ar. globiformis</i> | 16340 | tr | tr | 6.45 | 30.8 | tr | 7.1 | tr | 17.4 | 5.3 | 26.9 | tr | - | tr | tr | - | 1.7 | - | tr | - |
| <i>Ar. globiformis</i> | 3813T | tr | 1.4 | 8.41 | 45.1 | tr | 4.5 | tr | 13.6 | 4.0 | 17.1 | tr | - | - | tr | - | 1.3 | - | tr | 1.8 |
| <i>Ar. globiformis</i> | 3820 | - | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 42.5 | - | tr | tr | - | - | 17.7 | - | 28.5 | 7.8 | tr | - |
| <i>Ar. histidinolorans</i> | 3822T | tr | tr | 6.6 | 59.9 | tr | 3.2 | - | 2.8 | 3.0 | 19.3 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. ilicis</i> | 3659T | tr | tr | 2.9 | 54.1 | tr | 5.9 | tr | 7.1 | 1.5 | 19.8 | tr | - | - | tr | - | 1.6 | - | 2.1 | tr |
| <i>Ar. ilicis</i> | 7254 | tr | tr | 4.2 | 58.6 | - | 1.7 | tr | 3.4 | 2.3 | 24.7 | - | - | - | tr | - | tr | - | 2.7 | - |
| <i>Ar. ilicis</i> | 7255 | - | 3.4 | tr | 12.6 | tr | 7.9 | - | 36.6 | tr | 12.0 | tr | - | - | 22.9 | - | 1.1 | - | - | - |
| <i>Ar. mysorens</i> | 16125 | tr | tr | 25.0 | 43.7 | tr | 5.3 | tr | 5.6 | 3.8 | 11.2 | tr | - | tr | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ar. mysorens</i> | 16219T | - | tr | 27.2 | 43.5 | tr | 4.9 | - | 5.2 | 5.0 | 13.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. nicotianae</i> | 16126 | tr | 1.2 | 21.3 | 45.8 | tr | 4.5 | - | 8.5 | 5.1 | 12.7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. nicotianae</i> | 16305 | tr | 1.7 | 15.7 | 46.3 | - | 4.5 | - | 7.7 | 4.3 | 18.1 | - | - | - | tr | - | tr | - | - | - |
| <i>Ar. nicotianae</i> | 16159 | tr | 1.5 | 13.4 | 48.3 | tr | 5.7 | - | 9.3 | 3.1 | 17.0 | - | - | - | - | - | tr | - | - | - |
| <i>Ar. nicotinovorans</i> | 16253T | - | - | 5.3 | 75.5 | - | 2.2 | - | 3.1 | 1.2 | 12.8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. oxydans</i> | 16254 | tr | tr | 14.3 | 38.4 | tr | 5.1 | tr | 11.6 | 7.4 | 18.2 | tr | - | - | tr | - | 1.1 | - | tr | - |
| <i>Ar. oxydans</i> | 3816T | tr | 1.2 | 14.5 | 36.8 | - | 5.9 | tr | 11.3 | 6.6 | 17.1 | - | - | - | tr | - | 1.1 | - | tr | 1.9 |
| <i>Ar. oxydans</i> | 3817 | tr | tr | 5.7 | 56.5 | tr | 3.6 | tr | 2.8 | 2.9 | 24.2 | - | - | - | tr | - | tr | - | 1.3 | - |
| <i>Ar. pascens</i> | 16127 | tr | tr | 5.2 | 33.0 | tr | 3.8 | tr | 9.3 | 6.2 | 28.6 | tr | - | - | tr | - | 1.2 | - | 2.5 | - |
| <i>Ar. pascens</i> | 16255T | tr | tr | 6.9 | 42.5 | tr | 6.9 | 1.1 | 9.2 | 5.0 | 27.0 | - | - | - | - | - | tr | - | - | - |
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 16306 | tr | tr | 7.2 | 21.4 | tr | 9.2 | tr | 16.5 | 7.3 | 24.9 | tr | - | - | tr | 2.4 | 1.7 | - | 1.5 | - |
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 3821T | - | - | 2.9 | 19.9 | - | 6.1 | - | 19.8 | 3.7 | 31.9 | - | - | - | - | - | 2.3 | - | 1.5 | 8.0 |
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 16679 | - | tr | 2.5 | 26.0 | tr | 5.5 | tr | 21.0 | 3.5 | 35.2 | tr | - | - | - | - | 1.9 | - | tr | - |
| <i>Ar. protophormiae</i> | 16115 | - | - | 5.5 | 26.5 | - | 10.6 | - | 5.5 | 7.6 | 42.9 | - | - | - | - | - | tr | - | - | - |

| Spezies | LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1 ω 8i | 18:2 ω 6,9 | sum2 | sum 3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1 ω 8 | 19:0 |
|--------------------------|---------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------------------|-------------------|------|-------|------|------------|-----------------|------|
| <i>Ar. protophormiae</i> | 16324T | tr | - | 7.1 | 19.4 | tr | 6.8 | tr | 6.3 | 8.8 | 37.3 | tr | - | - | tr | - | tr | - | 1.2 | - |
| <i>Ar. ramosus</i> | 16256T | tr | tr | 5.9 | 40.9 | - | 6.5 | 1.0 | 11.4 | 4.3 | 25.9 | - | - | tr | - | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. ramosus</i> | 16185 | tr | - | 2.2 | 59.5 | - | 3.7 | - | 3.2 | tr | 28.9 | - | - | - | - | 1.4 | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. ramosus</i> | 17309T | tr | tr | 2.2 | 64.7 | - | 2.5 | tr | 1.1 | tr | 26.6 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ar. sulfureus</i> | 16128 | - | - | 15.4 | 45.9 | - | 4.5 | - | 1.7 | 4.7 | 22.5 | - | - | - | tr | - | tr | - | 1.4 | - |
| <i>Ar. sulfureus</i> | 16116 | tr | tr | 10.2 | 22.1 | tr | 3.8 | tr | 4.1 | 10.5 | 27.2 | tr | - | - | 1.6 | tr | tr | tr | 4.2 | 2.4 |
| <i>Ar. sulfureus</i> | 16694T | - | tr | 28.1 | 44.6 | - | 3.4 | - | 5.3 | 4.7 | 11.6 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. uratoxydans</i> | 16129 | tr | tr | 5.9 | 41.1 | tr | 6.1 | tr | 9.2 | 4.7 | 25.2 | tr | - | - | tr | tr | 1.8 | - | tr | tr |
| <i>Ar. uratoxydans</i> | 16117 | tr | tr | 11.4 | 41.9 | tr | 5.4 | tr | 4.5 | 4.2 | 19.2 | tr | - | - | tr | - | tr | tr | tr | tr |
| <i>Ar. uratoxydans</i> | 16220T | - | - | 8.6 | 26.1 | tr | 5.7 | - | 8.5 | 10.4 | 36.4 | 1.1 | - | - | - | - | 1.3 | - | tr | - |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 16130 | - | - | 6.5 | 58.1 | - | 3.9 | - | 3.5 | 3.8 | 24.1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 16257 | tr | - | 8.0 | 61.1 | - | 4.0 | - | 2.9 | 3.7 | 19.6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 3812T | tr | tr | 6.6 | 26.8 | tr | 4.7 | tr | 12.8 | 13.3 | 28.4 | tr | - | tr | tr | tr | 2.0 | - | 1.1 | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Spezies enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: *Ar. aurescens* (LMG 16145) enthielt zusätzlich einen unbekannten FAME (ECL 18.586) (2.3%) und 20:0 (12.3%); *Ar. duodecadis* (LMG 16468T) enthielt zusätzlich 18:0i (3.1%); *Ar. pascens* (LMG 16255T) enthielt zusätzlich 20:1 ω 9 (2.5%); *Ar. polychromogenes* (LMG 16306) enthielt zusätzlich einen unbekannten FAME (ECL 16.089) (1.2%); *Ar. polychromogenes* (LMG 16679T) enthielt zusätzlich einen unbekannten FAME (ECL 16.089) (1.2%); *Ar. sulfureus* (LMG 16116) enthielt zusätzlich 20:1 ω 9 (5.2%); *Ar. uratoxydans* (LMG 16117) enthielt zusätzlich c17:1 ω 7i (1.3%);

^b Die Fettsäuren c16:1 ω 7, t16:1 ω 7 und 16:1 ω 9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1 ω 9/18:1 ω 6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1 ω 7/t18:1 ω 9/t18:1 ω 12/c18:1 ω 9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.7: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen der analysierten *Arthrobacter*-Arten.^a

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 ^b | 17:0 | 18:0i | 18:2w6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1w8 | C19:0 |
|-----------------------------|---------|----------------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|-------------------|------|-------|----------|------|------|------|------------|---------|-------|
| <i>Ar. atrocyaneus</i> | 3814T | 1.9 | tr ^c | 1.8 | 6.2 | 34.3 | - | 4.0 | - | 2.1 | 4.9 | 43.3 | - | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. aurescens</i> | 16145 | - ^d | tr | tr | 4.3 | 27.7 | - | tr | - | 2.2 | 3.8 | 11.6 | - | tr | tr | - | tr | - | 10.8 | - | 12.1 | 2.5 |
| <i>Ar. aurescens</i> | 3815T | - | tr | tr | 4.2 | 51.8 | - | 3.1 | - | 3.1 | 2.0 | 32.1 | - | - | - | - | - | - | tr | - | tr | 1.1 |
| <i>Ar. citreus</i> | 16124 | - | - | - | 1.2 | 27.5 | - | 2.2 | - | 4.0 | tr | 61.0 | - | - | - | - | - | - | tr | - | - | - |
| <i>Ar. citreus</i> | 16146 | - | - | tr | 3.0 | 58.2 | - | 2.4 | - | 10.4 | 1.5 | 18.7 | - | - | - | - | tr | tr | 1.9 | - | - | tr |
| <i>Ar. citreus</i> | 16338T | - | - | - | - | 14.7 | - | - | - | 9.1 | 6.8 | 59.7 | - | - | - | - | 4.7 | - | 5.0 | - | - | - |
| <i>Ar. crystallopoietes</i> | 3819T | - | - | - | 5.6 | 52.1 | - | 1.3 | - | 3.4 | 5.4 | 32.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. duodecadis</i> | 16468T | tr | tr | 2.2 | 4.4 | tr | tr | 4.8 | tr | 9.2 | 6.5 | 2.8 | tr | 8.8 | 5.9 | tr | 14.3 | tr | 25.3 | 4.8 | 2.4 | 1.3 |
| <i>Ar. globiformis</i> | 16339 | tr | tr | 1.2 | 4.4 | 38.4 | - | 3.0 | - | 3.3 | 2.7 | 42.1 | tr | - | tr | tr | 1.0 | - | tr | - | 1.3 | - |
| <i>Ar. globiformis</i> | 16340 | tr | tr | 1.4 | 6.0 | 36.3 | tr | 7.1 | - | 10.5 | 2.2 | 32.4 | tr | - | - | tr | 1.1 | - | 1.1 | - | tr | - |
| <i>Ar. globiformis</i> | 3813T | - | - | tr | 7.3 | 47.2 | - | 6.2 | - | 7.2 | 1.9 | 29.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. globiformis</i> | 3820 | - | - | tr | - | tr | tr | - | 1.58 | 16.2 | - | 3.5 | - | tr | - | - | 40.9 | 1.2 | 21.8 | 9.1 | - | - |
| <i>Ar. histidinolorans</i> | 3822T | tr | - | 1.4 | 4.5 | 36.8 | tr | 3.8 | - | 2.4 | 2.7 | 44.1 | tr | - | tr | tr | tr | - | tr | - | 1.0 | - |
| <i>Ar. ilicis</i> | 3659T | - | tr | tr | 2.3 | 45.9 | - | 5.7 | - | 4.5 | 1.1 | 34.5 | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - | 2.0 | tr |
| <i>Ar. ilicis</i> | 7254 | 1.6 | tr | 1.8 | 3.4 | 46.9 | - | 1.8 | - | 3.7 | 1.3 | 36.4 | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - | 1.8 | - |
| <i>Ar. ilicis</i> | 7255 | - | tr | 3.8 | tr | 12.4 | tr | 8.7 | - | 32.6 | tr | 13.1 | - | tr | tr | - | 23.1 | - | 2.4 | - | - | - |
| <i>Ar. mysorens</i> | 16125 | - | - | - | 8.2 | 13.8 | - | 5.6 | - | 19.0 | 10.2 | 19.5 | - | - | - | - | 14.9 | - | 8.6 | - | - | - |
| <i>Ar. mysorens</i> | 16219T | - | tr | 1.0 | 28.6 | 42.2 | tr | 4.4 | - | 5.7 | 5.7 | 10.2 | - | tr | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. nicotianae</i> | 16126 | - | tr | 1.0 | 20.7 | 35.8 | tr | 4.0 | - | 12.3 | 10.5 | 14.8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. nicotianae</i> | 16305 | - | tr | 1.6 | 15.0 | 41.3 | tr | 4.9 | - | 9.1 | 6.2 | 20.1 | - | - | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. nicotianae</i> | 16159 | - | tr | 1.8 | 13.6 | 44.1 | tr | 5.5 | - | 11.3 | 4.4 | 17.0 | - | tr | - | - | - | - | tr | - | - | - |
| <i>Ar. nicotinovorans</i> | 16253T | - | - | tr | 3.5 | 46.6 | tr | 4.8 | - | 3.8 | 1.6 | 38.9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. oxydans</i> | 16254 | tr | tr | 1.4 | 10.2 | 32.2 | tr | 4.9 | - | 7.0 | 7.3 | 32.2 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ar. oxydans</i> | 3816T | - | - | tr | 5.1 | 14.3 | - | 6.1 | tr | 7.2 | 11.1 | 47.5 | - | - | tr | - | tr | tr | 1.6 | - | tr | 2.3 |
| <i>Ar. oxydans</i> | 3817 | - | - | - | 3.1 | 32.0 | - | 3.8 | - | 1.4 | 2.7 | 57.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. pascens</i> | 16127 | - | tr | tr | 4.8 | 33.0 | - | 4.6 | - | 3.5 | 1.8 | 49.8 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. pascens</i> | 16255T | - | tr | tr | 6.5 | 40.4 | - | 6.9 | tr | 5.0 | 2.7 | 36.2 | tr | - | - | - | - | - | tr | - | - | - |
| <i>"Ar. picolinophilus"</i> | 16262T | tr | - | 6.2 | - | tr | 1.1 | tr | 5.8 | 20.7 | tr | 1.4 | tr | 1.6 | - | tr | 17.2 | 1.3 | 8.4 | 12.5 | 3.6 | tr |
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 16306 | - | tr | tr | 8.8 | 28.2 | tr | 7.9 | tr | 9.0 | 6.9 | 33.4 | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 3821T | - | tr | 1.1 | 5.9 | 36.7 | tr | 6.9 | tr | 10.2 | 3.4 | 32.7 | tr | tr | - | tr | - | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 16679 | - | - | tr | tr | 8.0 | tr | 1.4 | tr | 3.7 | 1.1 | 14.7 | - | 20.0 | tr | - | - | - | tr | tr | tr | 46.9 |

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2w6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1w8 | C19:0 |
|--------------------------|---------|------|-------|------|-------|-------|------|-------|------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|---------|-------|
| <i>Ar. protophormiae</i> | 16115 | - | - | - | 5.2 | 24.2 | tr | 8.3 | - | 6.7 | 12.3 | 35.5 | - | tr | tr | - | tr | - | 1.3 | - | tr | - |
| <i>Ar. protophormiae</i> | 16324T | - | tr | 2.1 | 13.9 | 34.5 | tr | 5.4 | - | 9.1 | 9.7 | 19.8 | - | - | - | tr | 2.7 | - | 1.7 | - | - | - |
| <i>Ar. ramosus</i> | 16256T | - | tr | tr | 5.4 | 38.6 | - | 7.8 | tr | 4.8 | 1.6 | 39.2 | tr | - | - | - | - | tr | - | - | - | - |
| <i>Ar. ramosus</i> | 16185 | - | - | tr | 1.3 | 33.5 | - | 3.8 | - | 2.7 | 1.1 | 54.4 | - | tr | - | - | 1.0 | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ar. ramosus</i> | 17309T | 2.1 | tr | 1.1 | 1.7 | 48.1 | - | 2.5 | - | 1.2 | tr | 40.5 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ar. sulfureus</i> | 16128 | - | tr | - | 12.2 | 30.1 | - | 5.5 | tr | 1.6 | 9.0 | 28.1 | - | - | tr | - | tr | - | tr | - | 2.8 | - |
| <i>Ar. sulfureus</i> | 16116 | - | tr | tr | 25.0 | 55.4 | - | 2.44 | - | 4.1 | 2.3 | 7.3 | tr | - | - | - | - | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ar. sulfureus</i> | 16694T | - | - | - | 12.4 | 18.2 | - | 4.9 | - | 6.7 | 19.1 | 32.1 | - | - | - | - | - | - | 3.0 | - | 1.7 | - |
| <i>Ar. uratoxydans</i> | 16129 | - | tr | tr | 3.7 | 35.3 | tr | 4.7 | - | 5.1 | 2.7 | 43.4 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ar. uratoxydans</i> | 16117 | - | tr | tr | 11.9 | 34.4 | tr | 5.6 | tr | 8.4 | 10.1 | 21.8 | - | tr | tr | tr | tr | - | 1.9 | tr | tr | tr |
| <i>Ar. uratoxydans</i> | 16220T | - | tr | tr | 14.9 | 32.5 | tr | 3.9 | - | 9.3 | 12.6 | 20.4 | - | tr | tr | - | tr | - | 1.8 | - | tr | tr |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 16130 | - | - | - | 3.8 | 35.3 | - | 4.4 | - | 2.3 | 2.9 | 51.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 16257 | - | tr | tr | 6.8 | 46.3 | - | 5.3 | - | 2.3 | 2.5 | 36.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 3812T | - | tr | tr | 4.3 | 23.1 | - | 4.9 | - | 7.3 | 6.3 | 46.0 | - | tr | tr | tr | 1.2 | - | 1.3 | - | 1.1 | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Spezies enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: *Ar. aurescens* (LMG 16145) enthielt zusätzlich 19:0i (3.4%) und 20:0 (15.9%), *Ar. duodecadis* (LMG 16468T) enthielt zusätzlich c18:1w8i (1.5%); *Ar. pascens* (LMG 16255T) enthielt zusätzlich 20:0 (3.7%); *Ar. sulfureus* (LMG 16128) enthielt zusätzlich 19:0i (2.4%) und 20:1w9 (2.6%);

^b Die Fettsäuren c16:1w7, t16:1w7 und 16:1w9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1w6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1w9/18:1w6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1w7/t18:1w9/t18:1w12/c18:1w9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

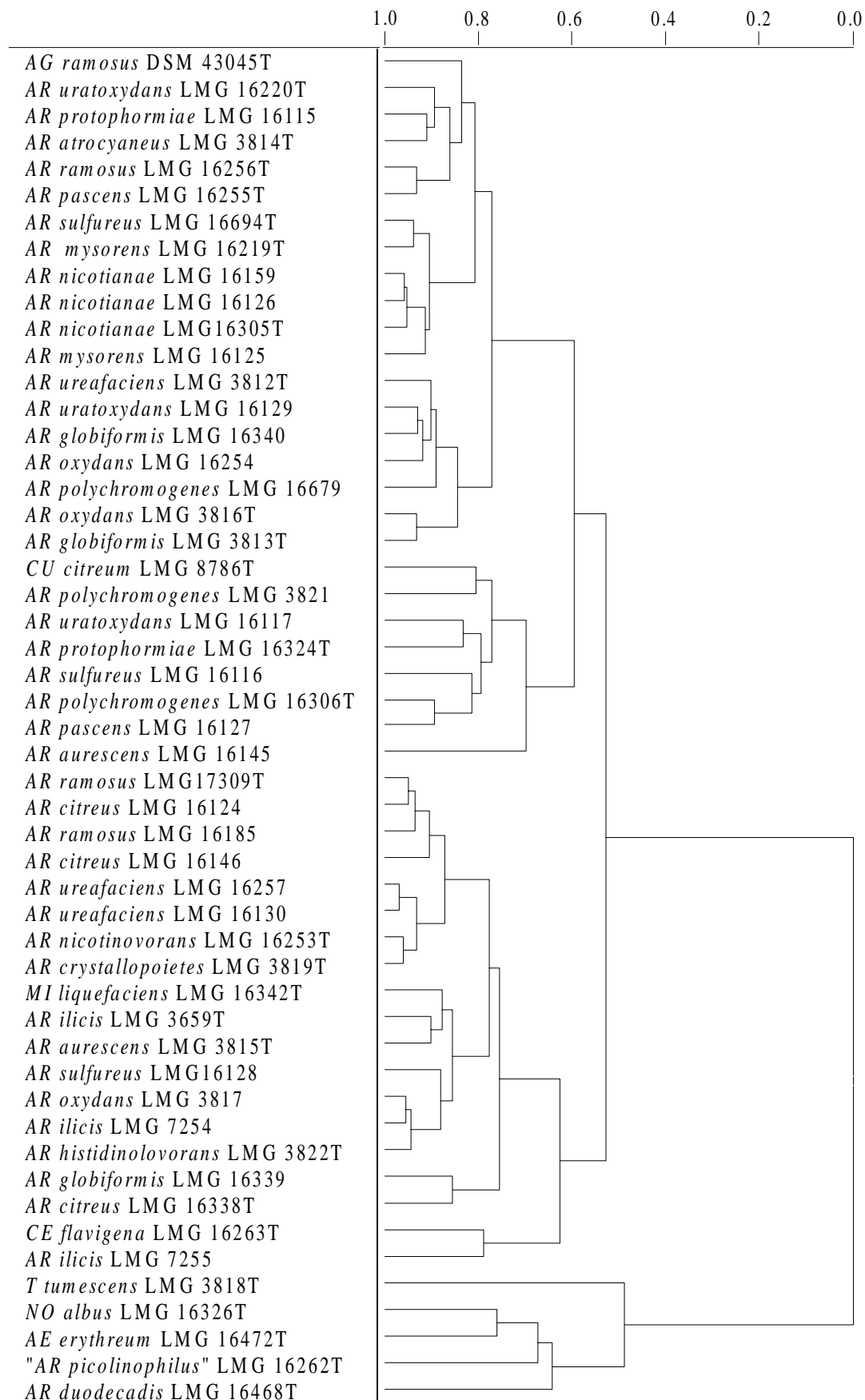


Abb. 3.2: Dendrogramm einer hierarchischen Clusteranalyse, basierend auf der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipidfraktionen aller untersuchten *Arthrobacter*-Stämme. Zur Orientierung wurden zusätzlich die Typstämme der Typarten der anderen analysierten coryneformen Gattungen berücksichtigt. Clusterverfahren: Incremental.

Tab. 3.8: Prozentuale Anteile der massenspektroskopisch analysierten intakten Phospholipide aus Stämmen der Gattung *Arthrobacter*. Der Peak mit der höchsten Signalintensität wurde auf 100% normiert.

| Lipidtyp | Molekulare Masse ^a | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|------|------|--------------|------|------|
| | 694 | 708 | 722 | 736 | 750 | 1296 | 1310 | 1324 | 1338 | 1352 |
| | ← | Phosphatidylglycerine | | | | → | ← | Cardiolipine | | |
| <i>Ar. atrocyaneus</i> 3814T | 74 | 27 | 100 | 9 | 16 | 15 | 7 | 22 | 7 | 11 |
| <i>Ar. aurescens</i> 16145 | 18 | 19 | 100 | 55 | 57 | tr | tr | tr | tr | 2 |
| <i>Ar. aurescens</i> 3815T | 100 | 18 | 54 | 6 | 6 | 21 | 6 | 13 | 4 | 4 |
| <i>Ar. citreus</i> 16124 | 100 | 23 | 98 | 5 | 7 | 21 | 9 | 18 | 3 | 7 |
| <i>Ar. citreus</i> 16146 | 100 | 66 | 18 | 2 | 2 | 23 | 5 | 5 | 2 | 1 |
| <i>Ar. citreus</i> 16338T | 45 | 37 | 100 | 8 | 12 | 9 | 4 | 15 | 4 | 9 |
| <i>Ar. crystallopoietes</i> 3819T | 100 | 25 | 83 | 6 | 5 | 13 | 5 | 11 | 2 | 3 |
| <i>Ar. duodecadis</i> 16468T | 10 | 14 | 20 | 24 | 20 | 5 | 4 | 11 | - | 7 |
| <i>Ar. globiformis</i> 16339 | 96 | 18 | 100 | 5 | 9 | 19 | 6 | 14 | 3 | 5 |
| <i>Ar. globiformis</i> 16340 | 100 | 87 | 89 | 26 | 19 | 20 | 19 | 23 | 11 | 7 |
| <i>Ar. globiformis</i> 3813T | 61 | 91 | 100 | 12 | 8 | 13 | 19 | 26 | 17 | 10 |
| <i>Ar. globiformis</i> 3820 | tr | tr | tr | tr | 44 | - | - | tr | - | - |
| <i>Ar. histidinolorans</i> 3822T | 13 | 54 | 100 | 58 | 25 | 1 | 2 | 7 | 8 | 7 |
| <i>Ar. ilicis</i> 3659T | 100 | 48 | 71 | 10 | 11 | 33 | 25 | 33 | 17 | 13 |
| <i>Ar. ilicis</i> 7254 | 100 | 22 | 95 | 8 | 14 | 21 | 11 | 32 | 8 | 18 |
| <i>Ar. ilicis</i> 7255 | 43 | 60 | 100 | 28 | 9 | 2 | 5 | 7 | 7 | 5 |
| <i>Ar. mysorens</i> 16125 | 100 | 23 | 26 | 3 | 3 | 40 | 11 | 13 | 4 | 1 |
| <i>Ar. mysorens</i> 16219T | 100 | 22 | 28 | 3 | 4 | 9 | 3 | 3 | tr | 1 |
| <i>Ar. nicotianae</i> 16126 | 70 | 87 | 100 | 12 | 8 | 14 | 8 | 11 | 5 | 3 |
| <i>Ar. nicotianae</i> 16305 | 100 | 52 | 92 | 7 | 7 | 6 | 3 | 5 | 2 | 1 |
| <i>Ar. nicotianae</i> 16159 | 100 | 47 | 64 | 4 | 3 | 1 | tr | tr | tr | tr |
| <i>Ar. nicotinovorans</i> 16253T | 100 | 18 | 37 | 4 | 5 | 16 | 5 | 7 | 2 | 2 |
| <i>Ar. oxydans</i> 16254 | 46 | 70 | 100 | 8 | 5 | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| <i>Ar. oxydans</i> 3816T | 50 | 74 | 100 | 10 | 6 | 4 | 4 | 10 | 8 | 6 |
| <i>Ar. oxydans</i> 3817 | 100 | 22 | 77 | 7 | 9 | 13 | 6 | 15 | 4 | 7 |
| <i>Ar. pascens</i> 16127 | 43 | 47 | 100 | 16 | 19 | 4 | 6 | 12 | 10 | 12 |
| <i>Ar. pascens</i> 16255T | 46 | 56 | 100 | 17 | 20 | 3 | 5 | 7 | 6 | 5 |
| " <i>Ar. picolinophilus</i> " 16262T | 5 | 14 | 34 | 92 | 55 | tr | tr | tr | tr | tr |
| <i>Ar. polychromogenes</i> 16306 | 51 | 100 | 98 | 14 | 9 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| <i>Ar. polychromogenes</i> 3821T | 27 | 100 | 85 | 21 | 11 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| <i>Ar. polychromogenes</i> 16679 | 18 | 86 | 100 | 13 | 6 | tr | 1 | 2 | 2 | 1 |
| <i>Ar. protophormiae</i> 16115 | 63 | 54 | 100 | 5 | 4 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| <i>Ar. protophormiae</i> 16324T | 100 | 40 | 58 | 4 | 3 | 1 | tr | tr | tr | tr |
| <i>Ar. ramosus</i> 17309T | 100 | 16 | 81 | 7 | 10 | 30 | 4 | 8 | 5 | 9 |
| <i>Ar. ramosus</i> 16118 | 47 | 71 | 100 | 3 | 21 | 2 | 2 | 3 | 5 | 4 |
| <i>Ar. ramosus</i> 16206T | 100 | 20 | 66 | 5 | 4 | 25 | 8 | 16 | 3 | 5 |
| <i>Ar. sulfureus</i> 16128 | 100 | 11 | 27 | 2 | 2 | 10 | 2 | tr | tr | tr |
| <i>Ar. sulfureus</i> 16116 | 100 | 12 | 16 | 2 | tr | 34 | 7 | 1 | 2 | tr |
| <i>Ar. sulfureus</i> 16694T | 100 | 14 | 18 | 2 | 2 | 4 | tr | tr | tr | tr |
| <i>Ar. uratoxydans</i> 16129 | 68 | 68 | 100 | 10 | 5 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| <i>Ar. uratoxydans</i> 16117 | 88 | 42 | 100 | 6 | 6 | 3 | 5 | 8 | 4 | 5 |
| <i>Ar. uratoxydans</i> 16220T | 68 | 42 | 100 | 7 | 4 | tr | 1 | 2 | 1 | 1 |
| <i>Ar. ureafaciens</i> 16130 | 100 | 21 | 60 | 5 | 6 | 10 | 6 | 13 | 3 | 4 |
| <i>Ar. ureafaciens</i> 16257 | 100 | 34 | 93 | 10 | 11 | 21 | 12 | 21 | 8 | 12 |
| <i>Ar. ureafaciens</i> 3812T | 47 | 72 | 100 | 9 | 6 | 5 | 2 | 4 | 2 | 2 |

^a Es wurden nur die Massen mit den höchsten Signalintensitäten angegeben. Bei den folgenden Stämmen wurden zusätzliche prominente Signale detektiert: *Ar. duodecadis* LMG 16468T bei $m/z=838$ (100%); *Ar. globiformis* LMG 3820 $m/z=762$ (100%), 764 (27%), 748 (34%) und 1026 (17%); „*Ar. picolinophilus*“ LMG 16262T $m/z=764$ (100%).

3.3 Die Gattung *Microbacterium*

Durch die erst kürzlich vollzogene Vereinigung der beiden Gattungen *Microbacterium* und *Aureobacterium* (Takeuchi et al., 1998) umfaßt die erweiterte Gattung *Microbacterium* derzeit 27 gültig beschriebene Arten. Hiervon wurden im Rahmen dieser Studie 22 verschiedene Stämme aus 13 Arten untersucht. Es handelte sich dabei ausschließlich um Vertreter der ursprünglichen Gattung *Aureobacterium*.

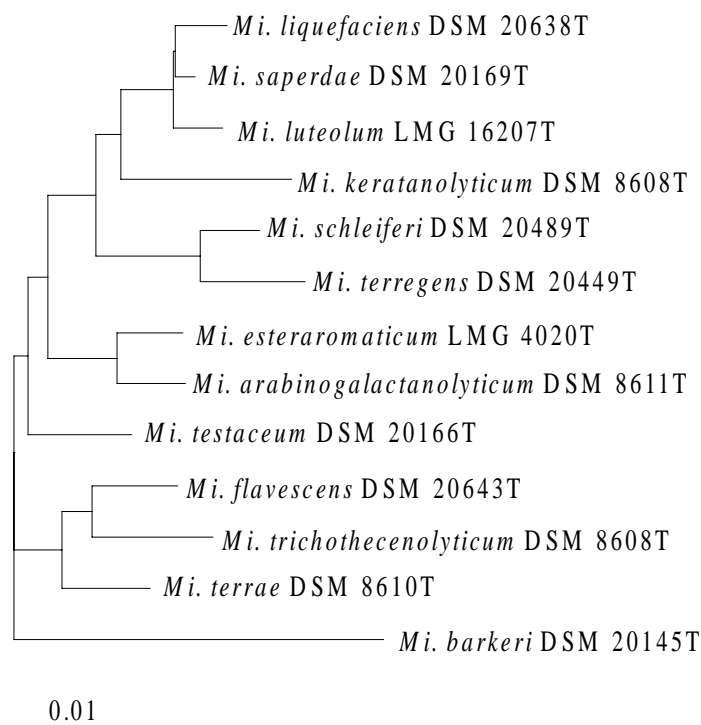


Abb. 3.3: Phylogenetisches Dendrogramm, basierend auf einem Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen der analysierten *Microbacterium*-Arten. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 1%.

Die 16S rRNA-Gensequenz von *Mi. esteraromaticum* LMG 4020T wurde nahezu vollständig bestimmt und mit den bereits bekannten Daten der anderen analysierten *Microbacterium*-Arten verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 und Tab. 3.9 zusammengefaßt. Die Werte der Sequenzähnlichkeiten zwischen den analysierten *Microbacterium*-Stämmen lagen in einem Bereich von 94.4-99.5%. Eine besonders enge Verwandtschaft war dabei zwischen den Typstämmen von *Mi. liquefaciens* DSM 20638T, *Mi. saperdae* DSM 20169T und *Mi. luteolum* LMG 16207T festzustellen (Sequenzähnlichkeiten über 99%). *Mi. barkeri* DSM 20145T bildete einen separaten Zweig im phylogenetischen Baum, deutlich abgegrenzt von den anderen analysierten Arten.

Tab. 3.9: 16S rRNA-Sequenzähnlichkeiten zwischen den Typstämmen der analysierten *Microbacterium*-Spezies.

| Organismen | 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| | <i>Mi. liquefaciens</i> | <i>Mi. arabinogalactano.</i> | <i>Mi. barkeri</i> | <i>Mi. esteraromaticum</i> | <i>Mi. flavescens</i> | <i>Mi. keratanolyticum</i> | <i>Mi. luteolum</i> | <i>Mi. saperdae</i> | <i>Mi. schleiferi</i> | <i>Mi. terrae</i> | <i>Mi. terregens</i> | <i>Mi. testaceum</i> |
| <i>Mi. arabinogalactan.</i> | 97.4 | | | | | | | | | | | |
| <i>Mi. barkeri</i> | 95.1 | 95.9 | | | | | | | | | | |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> | 96.9 | 98.3 | 95.9 | | | | | | | | | |
| <i>Mi. flavescens</i> | 96.9 | 97.1 | 95.4 | 96.8 | | | | | | | | |
| <i>Mi. keratanolyticum</i> | 97.7 | 96.5 | 94.4 | 95.9 | 96.7 | | | | | | | |
| <i>Mi. luteolum</i> | 99.1 | 97.8 | 95.4 | 97.2 | 97.0 | 97.7 | | | | | | |
| <i>Mi. saperdae</i> | 99.5 | 97.7 | 95.4 | 97.2 | 97.0 | 98.0 | 99.3 | | | | | |
| <i>Mi. schleiferi</i> | 97.7 | 96.6 | 94.7 | 96.3 | 97.4 | 97.3 | 97.5 | 97.8 | | | | |
| <i>Mi. terrae</i> | 97.2 | 98.0 | 96.1 | 97.3 | 98.6 | 96.6 | 97.3 | 97.3 | 97.3 | | | |
| <i>Mi. terregens</i> | 97.3 | 96.4 | 94.4 | 96.1 | 97.1 | 96.9 | 97.0 | 97.4 | 98.8 | 96.7 | | |
| <i>Mi. testaceum</i> | 97.7 | 97.8 | 95.6 | 97.0 | 97.7 | 97.0 | 97.8 | 97.9 | 97.3 | 96.7 | 96.8 | |
| <i>Mi. trichothecen.</i> | 96.4 | 97.2 | 95.6 | 96.4 | 98.4 | 96.2 | 96.7 | 96.7 | 96.6 | 98.0 | 96.4 | 98.1 |

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipide

Die Fettsäuremuster der analysierten Stämme der Gattung *Microbacterium* setzten sich vorwiegend aus 15:0i (<14%), 15:0a (7-44%), 16:0i (6-29%), 16:0 (2-12%), 17:0i (<20%) und 17:0a (24-73%) zusammen. In den Glykolipidfraktionen wurden zusätzlich in einigen Stämmen die Fettsäure 19:1ω8 detektiert, die in *Mi. schleiferi* LMG 16153T sogar Anteile von bis zu 18% erreichte. Wie die Tabellen 3.10-3.11 und das dazugehörige Dendrogramm (Abb. 3.4) demonstrieren, waren die individuellen stammspezifischen Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung bei den Microbakterien vergleichsweise gering. Relativ hoch war hingegen die quantitative Variabilität zwischen den verschiedenen Arten dieser Gattung. Obwohl ein vergleichsweise hoher Anteil an 17:0a verbunden mit geringeren Anteilen an 15:0a typisch zu sein scheint, ist eine diagnostische Fettsäurekombination daher nur schwer zu formulieren. Dies wird in dem Dendrogramm auch dadurch deutlich, daß die analysierten *Microbacterium*-Stämme verschiedene Gruppen bildeten, in denen auch Typstämmen der Typarten anderer coryneformer Gattungen präsent sind. Diese Gruppen spiegeln in ihrer Zusammensetzung nicht die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Microbacterium* wider.

Tab. 3.10: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen der analysierten *Microbacterium*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1 ω 8i | 18:2 ω 6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1 ω 8 | 19:0 |
|----------------------------|---------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------------------|-------------------|------|------|------|------------|-----------------|------|
| <i>Mi. arabinog.</i> | 16469T | tr ^c | - | 13.9 | 16.8 | - | 15.1 | - | 1.5 | 20.6 | 30.6 | - | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| <i>Mi. barkeri</i> | 16142 | - ^d | - | - | 10.1 | - | 11.4 | - | 3.5 | tr | 73.2 | - | - | - | - | - | - | - | tr | - |
| <i>Mi. barkeri</i> | 16341T | tr | - | tr | 13.1 | - | 14.0 | - | 2.8 | tr | 67.8 | tr | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> | 16187 | tr | - | 2.4 | 43.7 | - | 19.6 | - | 3.7 | 2.2 | 26.4 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> | 4020T | tr | tr | 3.9 | 36.2 | tr | 20.2 | tr | 6.6 | 2.1 | 27.0 | tr | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Mi. flavescens</i> | 16131T | - | - | 3.1 | 6.8 | - | 24.9 | - | 1.7 | 15.9 | 44.4 | tr | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Mi. keratanolyticum</i> | 16470T | tr | tr | 10.3 | 24.6 | tr | 25.0 | - | 2.0 | 11.1 | 24.0 | tr | - | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Mi. liquefaciens</i> | 16188 | tr | tr | 2.9 | 15.3 | tr | 7.8 | tr | 7.0 | 7.8 | 53.5 | tr | - | - | tr | tr | 1.1 | - | 1.6 | tr |
| <i>Mi. liquefaciens</i> | 16120 | - | - | 2.6 | 21.2 | - | 8.2 | - | 4.3 | 3.4 | 56.7 | tr | - | - | - | - | tr | - | 1.9 | - |
| <i>Mi. liquefaciens</i> | 16342T | tr | - | 1.7 | 16.3 | tr | 8.2 | - | 4.2 | 3.3 | 61.3 | tr | - | - | tr | - | tr | - | 2.1 | - |
| <i>Mi. luteolum</i> | 16207T | - | - | 6.2 | 24.6 | - | 12.3 | - | 11.8 | 7.9 | 20.0 | - | - | - | - | 11.1 | - | - | - | - |
| <i>Mi. saperdae</i> | 16343T | - | - | - | 24.2 | - | 28.9 | - | 5.6 | 2.6 | 38.7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mi. schleiferi</i> | 16189 | - | - | 4.6 | 11.2 | - | 5.9 | - | 6.0 | - | 58.0 | - | - | - | - | - | 5.5 | - | 8.9 | - |
| <i>Mi. schleiferi</i> | 16153T | - | - | tr | 15.7 | - | 8.5 | - | tr | tr | 64.1 | tr | - | - | tr | - | 2.2 | - | 4.5 | - |
| <i>Mi. terrae</i> | 16190 | tr | tr | 5.2 | 29.0 | tr | 11.0 | - | 5.6 | 7.3 | 36.1 | tr | - | - | tr | - | 3.0 | - | tr | - |
| <i>Mi. terrae</i> | 16471T | - | - | 3.8 | 29.1 | - | 9.4 | - | 9.8 | 5.1 | 31.0 | 1.7 | - | - | - | - | 10.0 | - | - | - |
| <i>Mi. testaceum</i> | 16237T | - | - | - | 12.7 | - | 32.2 | - | 7.8 | - | 47.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mi. testaceum</i> | 16144 | tr | - | 2.2 | 31.8 | tr | 29.5 | tr | 3.9 | 1.1 | 29.1 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Mi. testaceum</i> | 16344 | - | - | - | 16.0 | - | 29.0 | - | - | - | 55.1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mi. trichothecen.</i> | 16696T | - | - | - | 26.4 | - | 3.8 | - | - | 8.9 | 33.1 | - | - | - | - | - | 2.8 | - | 21.7 | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Spezies enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: *Mi. luteolum* (LMG 16207T) enthielt zusätzlich 19:0 d7,8 (2.4%) und 20:1 ω 9 (2.2%); *Mi. trichothecenolyticum* (LMG 16696T) enthielt zusätzlich 18:0i (3.4%).

^b Die Fettsäuren c16:1 ω 7, t16:1 ω 7 und 16:1 ω 9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1 ω 9/18:1 ω 6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1 ω 7/t18:1 ω 9/t18:1 ω 12/c18:1 ω 9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.11: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen der analysierten *Microbacterium*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2w6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1w8 | C19:0 |
|----------------------------|---------|----------------|-------|-----------------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|---------|-------|
| <i>Mi. barkeri</i> | 16142 | - ^d | - | tr ^c | - | 12.5 | - | 8.3 | - | 5.1 | tr | 69.2 | - | - | 1.0 | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Mi. barkeri</i> | 16341T | - | - | tr | tr | 11.1 | - | 10.0 | - | 4.1 | 1.1 | 69.2 | - | - | 1.3 | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> | 16187 | - | tr | tr | 1.7 | 37.7 | tr | 13.5 | - | 2.2 | 3.5 | 33.7 | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | tr | 1.0 | - |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> | 4020T | - | - | - | 3.6 | 34.6 | - | 16.5 | - | 4.2 | 3.2 | 37.8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mi. flavescens</i> | 16131T | - | tr | tr | 5.1 | 11.8 | - | 19.9 | - | 3.1 | 20.2 | 33.7 | tr | tr | 1.0 | - | tr | - | tr | - | 1.3 | - |
| <i>Mi. keratanolyticum</i> | 16470T | 1.8 | tr | 2.1 | 7.8 | 19.1 | tr | 20.3 | - | 3.7 | 13.1 | 24.7 | tr | tr | tr | tr | 1.3 | tr | tr | - | tr | 1.3 |
| <i>Mi. liquefaciens</i> | 16188 | tr | - | 1.3 | 3.0 | 16.8 | - | 6.3 | - | 7.3 | 6.9 | 50.9 | - | tr | tr | - | 1.2 | - | 1.6 | - | 2.8 | - |
| <i>Mi. liquefaciens</i> | 16120 | 1.1 | tr | 1.6 | 2.1 | 16.4 | - | 6.3 | - | 4.9 | 3.4 | 58.1 | - | tr | tr | - | tr | - | 1.4 | - | 3.4 | - |
| <i>Mi. liquefaciens</i> | 16342T | - | - | tr | 1.4 | 14.6 | - | 7.0 | - | 5.6 | 2.9 | 59.2 | tr | tr | tr | tr | 1.6 | - | 1.7 | - | 3.3 | - |
| <i>Mi. luteolum</i> | 16207T | - | tr | tr | 7.0 | 28.1 | tr | 11.3 | tr | 6.3 | 11.1 | 26.1 | tr | tr | tr | - | tr | 3.8 | 1.4 | - | tr | - |
| <i>Mi. saperdae</i> | 16343T | tr | tr | 1.6 | 1.1 | 23.9 | - | 21.3 | - | 6.6 | 2.4 | 34.6 | - | tr | 2.7 | - | 1.3 | - | 1.5 | - | 1.8 | - |
| <i>Mi. schleiferi</i> | 16189 | tr | - | 3.4 | tr | 10.7 | - | 3.3 | - | 6.6 | tr | 34.1 | - | tr | 1.5 | tr | 4.5 | tr | 7.7 | - | 17.6 | tr |
| <i>Mi. schleiferi</i> | 16153T | - | - | - | tr | 20.3 | - | 6.8 | - | tr | tr | 45.8 | - | tr | 2.4 | - | tr | - | 4.3 | - | 12.8 | tr |
| <i>Mi. terrae</i> | 16190 | 2.0 | tr | 1.2 | 4.6 | 28.5 | tr | 6.0 | - | 5.0 | 7.4 | 34.0 | - | tr | 1.1 | tr | tr | - | 6.4 | - | tr | tr |
| <i>Mi. terrae</i> | 16471T | tr | tr | 2.3 | 2.8 | 26.2 | tr | 5.8 | - | 10.8 | 4.4 | 27.2 | - | 1.86 | tr | tr | 2.2 | - | 13.1 | - | tr | tr |
| <i>Mi. testaceum</i> | 16237T | - | tr | tr | tr | 8.9 | tr | 29.3 | - | 4.5 | 1.8 | 47.3 | - | tr | 4.1 | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Mi. testaceum</i> | 16144 | - | tr | - | 1.9 | 25.7 | tr | 27.6 | - | 2.5 | 4.6 | 34.5 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Mi. testaceum</i> | 16344 | - | - | - | - | 13.1 | - | 25.3 | - | 4.1 | 2.2 | 52.7 | - | - | 2.6 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mi. trichothecen.</i> | 16696T | - | - | 2.4 | - | 29.1 | - | 3.3 | - | 2.6 | 7.4 | 29.6 | - | - | 2.6 | - | - | - | 2.8 | - | 20.2 | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Spezies enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: *Mi. schleiferi* (LMG 16189 und LMG 16153T) enthielten zusätzlich 20:0 (5.9% bzw. 3.8%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

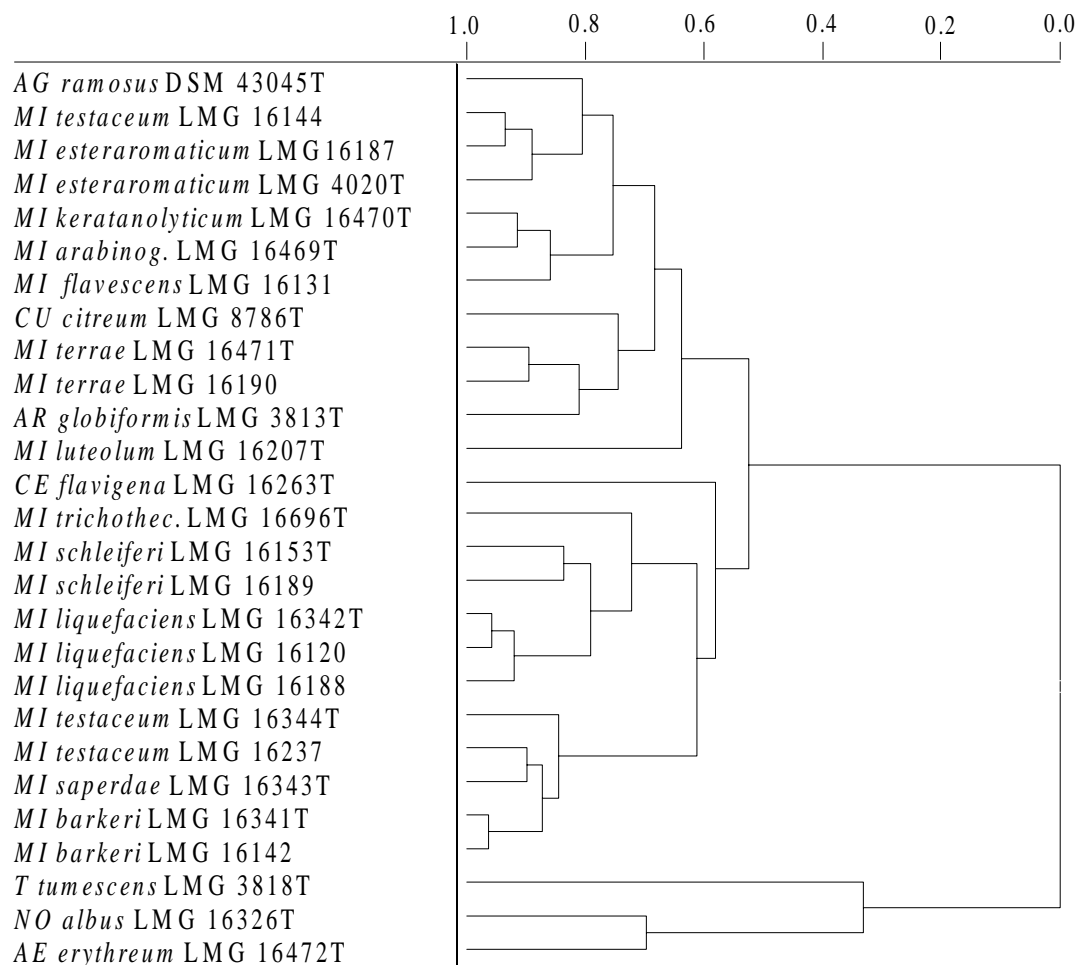


Abb. 3.4: Dendrogramm, welches die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der analysierten *Microbacterium*-Stämme, basierend auf den Fettsäuren der Phospholipidfraktionen, zeigt.

Zusammensetzung der intakten polaren Lipide

Die Phospholipidfraktionen der analysierten *Microbacterium*-Stämme enthielten ein relativ breites Spektrum von Phosphatidylglycerinen und Cardiolipinen, wie Tab. 3.12 zu entnehmen ist. Die stärksten Signale wurden bei den Massen $m/z = 708$, 722 und 750 detektiert. Wie schon bei den Fettsäuren zeigten auch hier die verschiedenen Stämme einer Art in den überwiegenden Fällen ein sehr einheitliches Bild. Innerhalb der Gattung traten jedoch deutliche Abweichungen gerade in der Zusammensetzung der Phosphatidylglycerine auf. Ein charakteristisches Muster qualitativer und quantitativer Art war aus diesem Grund kaum festzustellen. Bei einigen Stämmen konnte offensichtlich keine vollständige Trennung der Phospho- und Glykolipide erzielt werden. Dies machte sich durch die Anwesenheit von Diglykosyldiacylglyceriden in den Phospholipidfraktionen bemerkbar.

Tab. 3.12: Prozentuale Anteile der massenspektroskopisch analysierten intakten Phospholipide aus den analysierten Stämmen der Gattung *Microbacterium*. Der Peak mit der höchsten Signalintensität wurde auf 100% normiert.

| | Molekulare Masse ^a | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|------|------|------|--------------|--|---|
| | 694 | 708 | 720 | 722 | 736 | 750 | 762 | 852 | 892 | 906 | 920 | 1310 | 1324 | 1338 | 1352 | | |
| Lipidtyp | ← | Phosphatidylglycerine | | | | | | → | PI | ← | DGD ^b | | → | ← | Cardiolipine | | → |
| <i>Mi. arabinog.</i> 16469T | 37 | 72 | 17 | 100 | 17 | 14 | tr | 1 | tr | tr | tr | 4 | 1 | 4 | 3 | | |
| <i>Mi. barkeri</i> 16142 | 2 | 20 | 11 | 58 | 42 | 100 | 2 | 1 | 1 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | | |
| <i>Mi. barkeri</i> 16341T | 4 | 27 | 13 | 57 | 41 | 100 | 3 | 2 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | | |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> 16187 | 26 | 82 | 16 | 100 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | tr | tr | 3 | 3 | 6 | 2 | | |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> 4020T | 60 | 100 | 14 | 96 | 7 | 5 | 1 | - | tr | 2 | - | 5 | 7 | 8 | tr | | |
| <i>Mi. flavescens</i> 16131T | 26 | 94 | 15 | 100 | 32 | 30 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 7 | 7 | 14 | 6 | | |
| <i>Mi. keratanolyticum</i> 16470T | 24 | 91 | 19 | 100 | 30 | 29 | 3 | 3 | 8 | 4 | 5 | 9 | 17 | 23 | 5 | | |
| <i>Mi. liquefaciens</i> 16188 | 4 | 12 | 17 | 100 | 7 | 59 | - | - | 24 | 10 | 32 | tr | - | - | - | | |
| <i>Mi. liquefaciens</i> 16120 | 12 | 36 | 16 | 100 | 10 | 32 | 4 | 4 | 8 | 4 | 8 | 10 | 25 | 41 | 23 | | |
| <i>Mi. liquefaciens</i> 16342T | 12 | 31 | 17 | 100 | 14 | 66 | 2 | 2 | 24 | 10 | 27 | 2 | 3 | 10 | 3 | | |
| <i>Mi. luteolum</i> 16207T | 26 | 69 | 17 | 100 | 8 | 10 | 80 | 4 | 30 | 7 | 10 | 20 | 38 | 8 | 36 | | |
| <i>Mi. saperdae</i> 16343T | 7 | 64 | 11 | 100 | 21 | 23 | 4 | 3 | 35 | 9 | 5 | 5 | 20 | 28 | 14 | | |
| <i>Mi. schleiferi</i> 16189 | 4 | 15 | 17 | 63 | 27 | 100 | 5 | 2 | 7 | 6 | 5 | 1 | 1 | 2 | 4 | | |
| <i>Mi. schleiferi</i> 16153T | 2 | 17 | 15 | 99 | 33 | 100 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | tr | tr | 1 | 2 | | |
| <i>Mi. terrae</i> 16190 | 7 | 38 | 17 | 100 | 16 | 18 | 10 | 54 | 8 | 5 | 3 | 7 | 10 | 17 | 32 | | |
| <i>Mi. terrae</i> 16471T | 17 | 87 | 16 | 100 | 21 | 16 | 2 | 2 | 37 | 27 | 13 | 2 | 4 | 4 | 2 | | |
| <i>Mi. testaceum</i> 16237 | 9 | 81 | 14 | 100 | 83 | 47 | 2 | 2 | 14 | 10 | 11 | 1 | 15 | 25 | 25 | | |
| <i>Mi. testaceum</i> 16144 | 8 | 100 | 10 | 74 | 10 | 6 | tr | tr | 9 | 2 | tr | tr | 2 | 2 | tr | | |
| <i>Mi. testaceum</i> 16344T | 7 | 100 | 16 | 43 | 48 | 40 | 1 | tr | 3 | 4 | tr | tr | 3 | 4 | 4 | | |
| <i>Mi. trichothecen.</i> 16696T | 5 | 3 | 6 | 15 | 6 | 100 | 4 | 4 | 4 | 3 | 6 | 1 | 3 | 4 | 13 | | |

^a Es wurden nur die Massen mit den höchsten Signalintensitäten angegeben. Bei dem Stamm *Mi. trichothecenolyticum* LMG 16696T wurde zusätzlich ein prominentes Signal bei $m/z=922$ (27%) detektiert.

^b DGD= Diglykosyldiacylglycerin

3.4 Die Gattung *Cellulomonas*

Die Gattung *Cellulomonas* wurde schon 1923 von Bergey et al. für Organismen beschrieben, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie Cellulose abbauen können. Heute gehören der Gattung neun Arten an, von denen *Ce. flavigena* die Typart darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 17 *Cellulomonas*-Stämme charakterisiert, die acht verschiedenen Arten angehörten.

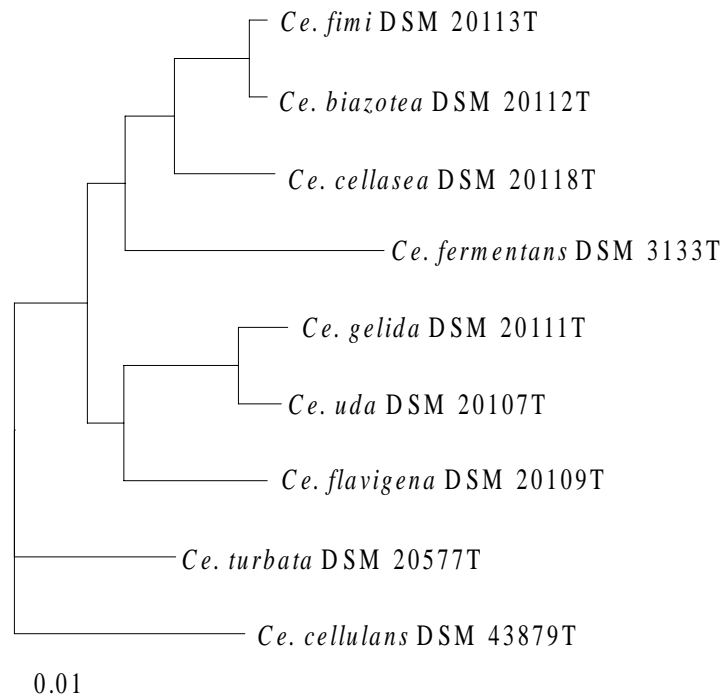


Abb. 3.5: Phylogenetisches Dendrogramm, basierend auf einem Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen der analysierten *Cellulomonas*-Arten. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 1%.

Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den untersuchten Arten der Gattung *Cellulomonas* sind in Abb. 3.5 und Tab. 3.13 dargestellt. Die Arten *Ce. fimi* DSM 20113T und *Ce. biazotea* DSM 20112T sowie *Ce. gelida* DSM 20111T und *Ce. uda* DSM 20107T bilden jeweils Paare, die durch eine hohe 16S rRNA/DNA-Sequenzähnlichkeit gekennzeichnet sind (99.6 und 98.8%). *Ce. flavigena* DSM 20109T ist mit der *Ce. gelida*/*Ce. uda*-Gruppe eng verwandt. *Ce. cellasea* DSM 43879T ist hingegen mit der *Ce. fimi*/*Ce. biazotea*-Gruppe assoziiert. *Ce. cellulans* scheint mit relativ geringen Sequenzähnlichkeiten, die sich in einem Bereich von 93.4-95.1% bewegen, innerhalb der Gattung eine Sonderstellung einzunehmen.

Tab. 3.13: 16S rRNA-Sequenzähnlichkeiten zwischen den Typstämmen der analysierten *Cellulomonas*-Spezies.

| Organismen | 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| | <i>Ce. flavigena</i> | <i>Ce. biazotea</i> | <i>Ce. cellasea</i> | <i>Ce. cellulans</i> | <i>Ce. fermentans</i> | <i>Ce. fimi</i> | <i>Ce. gelida</i> | <i>Ce. turbata</i> |
| <i>Ce. biazotea</i> | 96.2 | | | | | | | |
| <i>Ce. cellasea</i> | 95.8 | 97.7 | | | | | | |
| <i>Ce. cellulans</i> | 93.4 | 94.1 | 94.0 | | | | | |
| <i>Ce. fermentans</i> | 94.7 | 95.6 | 96.0 | 93.6 | | | | |
| <i>Ce. fimi</i> | 96.1 | 99.6 | 97.9 | 94.2 | 95.7 | | | |
| <i>Ce. gelida</i> | 96.8 | 95.9 | 95.8 | 94.2 | 94.5 | 95.9 | | |
| <i>Ce. turbata</i> | 95.2 | 95.5 | 96.1 | 95.1 | 94.6 | 95.3 | 95.7 | |
| <i>Ce. uda</i> | 96.3 | 96.1 | 96.0 | 95.0 | 94.8 | 96.1 | 98.8 | 95.7 |

Zusammensetzung der Fettsäuren der polaren Lipidfraktionen

Den Tabellen 3.14 und 3.15 sind die Analysenergebnisse der Fettsäuren der polaren Lipidfraktionen aller untersuchten Typ- und Referenzstämmen der Gattung *Cellulomonas* zu entnehmen. Abb. 3.6 zeigt zusätzlich die Ergebnisse der Clusteranalyse der Phospholipidfettsäuren. Für die analysierten Organismen scheint sowohl bei den Glyko- als auch bei den Phospholipidfettsäuren eine Kombination aus 15:0i (<5%), 15:0a (15-45%), 16:0i (1-20%), 16:0 (1-49%) und 17:0a (9-37%) charakteristisch zu sein. Diagnostisch bedeutend sind die relativ geringen Anteile an iso-verzweigten Fettsäuren verbunden mit einem für coryneforme Bakterien ungewöhnlich hohen Anteil an 14:0 (bis 10%) und 16:0.

Besonders auffällig verhielten sich die Stämme *Ce. cellasea* LMG 16323T, *Ce. fimi* LMG 16132 und *Ce. turbata* LMG 16346. So fehlte in *Ce. cellasea* 15:0a und 17:0a, während sehr hohe Anteile an Octadecensäuren auftraten. Die Sequenzierung der 16S rDNA bestätigte jedoch die Authentizität dieses Stammes, der sich durch eine völlig andere Fettsäurekombination von den anderen Arten der Gattung *Cellulomonas* unterschied. Innerhalb der Art *Ce. fimi* war die quantitative Variabilität insbesondere bei den Anteilen der Fettsäuren 15:0i, 16:0 und 18:0 sehr hoch. Die Sequenzierungsergebnisse ergaben keine Erklärung für die Sonderstellung von *Ce. fimi* LMG 16239 im Dendrogramm (Abb. 3.6), zeigten aber, daß *Ce. fimi* LMG 16132 in die phylogenetische Umgebung von *Ar. nicotinovorans* einzuordnen ist (Sequenzähnlichkeit 97.6%). Die Verschiebungen im Fettsäuremuster innerhalb der analysierten Stämme von *Ce. turbata* konnten ebenfalls auf Fehlidentifizierungen zurückgeführt werden. *Ce. turbata* LMG 16346 wies eine hohe Sequenzähnlichkeit von 99.6% zu *Mi. liquefaciens* DSM 20638T auf.

Tab. 3.14: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen der analysierten *Cellulomonas*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1 ω 8i | 18:2 ω 6,9 | sum2 | sum 3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1 ω 8 | 19:0 |
|----------------------|---------|----------------|-----------------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------------------|-------------------|------|-------|------|------------|-----------------|------|
| <i>Ce. biazotea</i> | 16695T | 1.5 | 2.4 | 3.9 | 40.1 | 1.0 | 6.0 | tr | 15.7 | 1.7 | 16.4 | 2.7 | - | - | tr | - | 6.8 | - | tr | tr |
| <i>Ce. cellasea</i> | 16323T | - ^d | tr ^c | - | - | tr | - | 1.3 | 10.9 | - | 1.6 | 1.2 | - | 13.4 | 65.7 | 1.2 | 3.0 | - | - | - |
| <i>Ce. cellulans</i> | 16259 | - | tr | 3.0 | 44.9 | tr | 5.3 | - | 25.7 | tr | 19.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ce. cellulans</i> | 16238 | tr | 3.2 | 4.0 | 44.3 | 1.1 | 3.6 | - | 14.2 | tr | 23.5 | tr | - | 1.9 | 1.6 | - | 1.0 | - | - | - |
| <i>Ce. cellulans</i> | 16121 | - | - | 4.4 | 40.5 | - | 4.7 | - | 25.8 | - | 24.5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ce. cellulans</i> | 16221T | 2.2 | 2.4 | 3.3 | 40.3 | 2.8 | 20.6 | tr | 17.3 | tr | 8.4 | tr | - | - | tr | - | tr | - | - | - |
| <i>Ce. fimi</i> | 16132 | - | - | 10.3 | 38.8 | - | 5.5 | - | 9.1 | 9.2 | 27.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ce. fimi</i> | 16239 | tr | - | 4.7 | 28.5 | - | tr | - | 1.1 | 10.9 | 15.4 | - | - | tr | tr | - | 4.8 | - | 11.8 | tr |
| <i>Ce. fimi</i> | 16345T | tr | 2.0 | tr | 34.9 | tr | 5.3 | tr | 15.4 | tr | 25.5 | tr | - | - | tr | - | 12.2 | - | tr | - |
| <i>Ce. flavigena</i> | 16263T | tr | 10.2 | tr | 40.6 | 2.6 | tr | tr | 35.6 | tr | 5.3 | 1.0 | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ce. gelida</i> | 16122 | - | 1.1 | tr | 32.1 | 3.2 | 1.6 | - | 30.4 | tr | 20.8 | 6.3 | - | - | tr | - | 2.5 | - | - | - |
| <i>Ce. gelida</i> | 16697T | tr | 2.3 | 2.6 | 25.6 | tr | 7.7 | tr | 35.4 | 1.2 | 19.1 | tr | - | - | tr | - | 3.4 | - | tr | - |
| <i>Ce. turbata</i> | 16346 | - | - | - | 15.6 | - | 12.8 | - | - | - | 71.6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ce. turbata</i> | 16191 | - | 4.8 | 2.3 | 47.5 | 3.4 | 1.1 | - | 21.7 | tr | 14.0 | tr | - | - | tr | - | 1.0 | - | - | - |
| <i>Ce. turbata</i> | 4072T | - | - | - | 28.3 | - | 13.3 | - | 21.1 | - | 37.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ce. uda</i> | 16123 | tr | 3.1 | 1.5 | 18.5 | tr | 12.0 | tr | 17.9 | 1.1 | 36.0 | tr | 1.1 | - | tr | tr | 1.5 | 1.1 | tr | - |
| <i>Ce. uda</i> | 16327T | - | 1.8 | 2.0 | 15.3 | - | 4.4 | - | 48.5 | 1.6 | 18.7 | tr | - | - | tr | - | 5.0 | - | - | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Spezies enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: *Ce. fimi* (LMG 16239) enthielt zusätzlich 18:0i (1.8%), 19:0i (12.1%), und 20:0 (5.8%); *Ce. flavigena* (LMG 16263T) enthielt zusätzlich 15:1 ω 7i (2.0%); *Ce. uda* (LMG 16123) enthielt zusätzlich c17:1 ω 7i (1.7%).

^b Die Fettsäuren c16:1 ω 7, t16:1 ω 7 und 16:1 ω 9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1 ω 9/18:1 ω 6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1 ω 7/t18:1 ω 9/t18:1 ω 12/c18:1 ω 9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.15: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen der analysierten *Cellulomonas*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2w6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1w8 | C19:0 |
|----------------------|---------|------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|---------|-------|
| <i>Ce. biazotea</i> | 16695T | 2.4 | tr ^c | 4.9 | 5.5 | 44.0 | 1.5 | 3.8 | tr | 11.9 | tr | 10.6 | - | 1.2 | tr | tr | 1.8 | tr | 6.3 | - | tr | tr |
| <i>Ce. cellasea</i> | 16323T | 2.6 | - ^d | 3.0 | - | tr | tr | - | tr | 14.9 | - | 1.2 | - | 1.4 | - | 10.0 | 53.6 | tr | 7.5 | - | - | - |
| <i>Ce. cellulans</i> | 16259 | tr | - | 1.1 | 2.5 | 49.4 | tr | 2.1 | 1.42 | 20.3 | tr | 12.9 | - | tr | - | - | 1.4 | - | tr | - | - | - |
| <i>Ce. cellulans</i> | 16238 | - | tr | tr | 1.6 | 38.7 | 1.0 | 2.3 | tr | 13.3 | tr | 25.8 | - | tr | - | 5.2 | 4.8 | tr | 2.2 | - | tr | - |
| <i>Ce. cellulans</i> | 16121 | - | - | - | - | 53.8 | - | 2.2 | - | 23.6 | - | 20.4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ce. cellulans</i> | 16221T | 2.6 | 2.0 | 3.0 | 2.4 | 43.4 | 2.4 | 14.0 | - | 19.7 | tr | 6.9 | - | tr | tr | tr | tr | - | 1.4 | - | - | - |
| <i>Ce. fimi</i> | 16132 | - | tr | tr | 15.1 | 39.1 | tr | 3.8 | - | 7.4 | 13.0 | 15.6 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ce. fimi</i> | 16239 | - | tr | tr | 5.6 | 17.0 | tr | tr | - | 1.4 | 10.4 | 17.1 | - | tr | 1.7 | tr | tr | - | 5.7 | - | 13.6 | tr |
| <i>Ce. fimi</i> | 16345T | - | - | 1.8 | tr | 25.2 | - | 4.0 | - | 16.6 | tr | 21.4 | - | tr | tr | tr | 3.0 | tr | 18.5 | - | 1.1 | tr |
| <i>Ce. flavigena</i> | 16263T | - | - | 3.7 | tr | 28.5 | 1.2 | tr | tr | 44.9 | - | 4.5 | - | tr | - | tr | 5.2 | - | 3.6 | - | tr | - |
| <i>Ce. gelida</i> | 16122 | tr | - | 5.2 | tr | 33.0 | 2.9 | 1.1 | - | 29.7 | tr | 13.8 | - | 4.9 | - | - | tr | - | 5.8 | - | tr | tr |
| <i>Ce. gelida</i> | 16697T | - | tr | 5.3 | 1.7 | 15.3 | tr | 3.9 | - | 37.0 | tr | 17.0 | tr | tr | tr | tr | 3.8 | tr | 9.5 | - | tr | - |
| <i>Ce. turbata</i> | 16346 | - | - | - | - | 19.6 | - | 9.4 | - | 5.4 | - | 65.6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ce. turbata</i> | 16191 | - | - | 3.9 | 1.4 | 56.9 | 3.3 | tr | tr | 18.0 | tr | 6.9 | - | tr | - | tr | tr | - | 2.1 | - | tr | - |
| <i>Ce. turbata</i> | 4072T | - | tr | 2.4 | 1.9 | 30.7 | tr | 6.7 | - | 24.7 | tr | 16.0 | - | tr | - | tr | 6.5 | tr | 4.3 | - | tr | - |
| <i>Ce. uda</i> | 16123 | - | tr | 3.4 | 1.6 | 18.2 | 1.0 | 12.5 | - | 22.0 | 1.1 | 33.5 | - | tr | tr | - | tr | tr | 1.8 | - | tr | tr |
| <i>Ce. uda</i> | 16327T | - | - | - | - | 11.6 | - | - | - | 63.7 | - | 6.8 | - | - | - | - | 7.7 | - | 10.1 | - | - | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Spezies enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: *Ce. biazotea* (LMG 16695T) enthielt zusätzlich 20:0 (1.8%), *Ce. cellulans* (LMG 16121T) enthielt zusätzlich c16:1ω8i (2.1%); *Ce. fimi* (LMG 16239) enthielt zusätzlich 19:0i (13.6%), und 20:0 (9.7%); *Ce. fimi* (LMG 16345T) enthielt zusätzlich 20:0 (3.8%); *Ce. flavigena* (LMG 16263T) enthielt zusätzlich 3-OH 16:0 (1.6%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

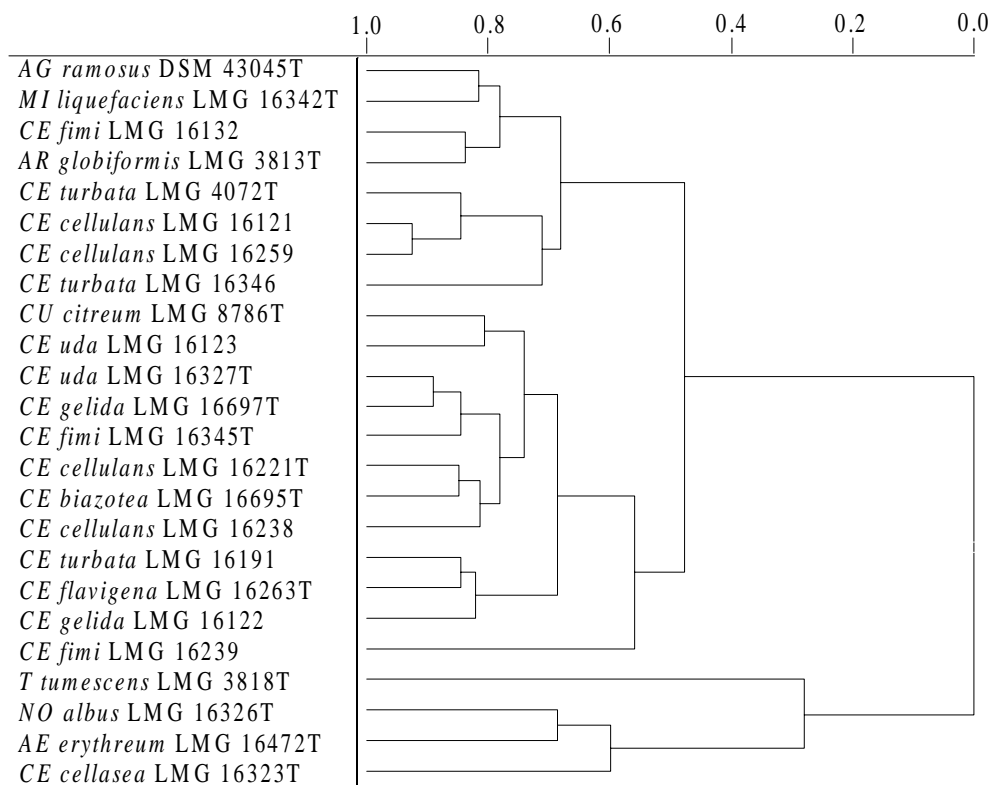


Abb. 3.6: Dendrogramm einer Clusteranalyse, basierend auf der Phospholipidfettsäurezusammensetzung der analysierten *Cellulomonas*-Stämmen. Clusterverfahren: Incremental.

Zusammensetzung der intakten polaren Lipide

Die Phospholipidfraktionen der analysierten *Cellulomonas*-Stämme zeichneten sich, wie Tab. 3.16 zu entnehmen ist, durch eine hohe strukturelle Vielfalt aus. Es wurden neben einer großen Anzahl verschiedener Phosphatidylglycerine und Cardiolipine auch Phosphatidylinositol, sowie mehrere bisher nicht identifizierte Verbindungen in dem Massenbereich zwischen $m/z = 900$ und 1150 detektiert. Auffällig waren weiterhin die sehr hohen Anteile an Fragmentationen ($m/z = 674, 649$), die durch Abspaltung von Glycerin aus den Phosphatidylglycerinen bzw. Cardiolipinen hervorgingen. Zwischen den Stämmen einer Art waren z. T. erhebliche Unterschiede in der quantitativen Zusammensetzung zu erkennen, so daß eine Einteilung auf Artniveau anhand dieser Parameter ausgeschlossen werden muß. Die heterogene Zusammensetzung ermöglichte jedoch zusammen mit den relativ hohen Signalintensitäten der Cardiolipine eine Unterscheidung der Gattung *Cellulomonas* von den anderen coryneformen Bakterien anhand der massenspektroskopisch nachgewiesenen intakten Phospholipide.

Tab. 3.16: Prozentuale Anteile der massenspektroskopisch analysierten intakten Phospholipide aus den analysierten Stämmen der Gattung *Cellulomonas*. Der Peak mit der höchsten Signalintensität wurde auf 100% normiert.

| | Molekulare Masse ^a | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|-----|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|--------------|------|------|---|
| | 674 | 694 | 699 | 708 | 720 | 722 | 750 | 809 | 918 | 932 | 946 | 1086 | 1100 | 1114 | 1296 | 1310 | 1324 | 1338 | 1352 | |
| Lipidtyp | PA ^b | ← | Phosphatidylglycerine | | | | | → | ? | ← | ? | → | ← | ? | → | ← | Cardiolipine | | | → |
| <i>Ce. biazotea</i> 16695T | 60 | 13 | 100 | 15 | 9 | 18 | 11 | 16 | 11 | 13 | 6 | 7 | 8 | 9 | 4 | 5 | 10 | 11 | 8 | |
| <i>Ce. cellulase</i> 16323T | 54 | 5 | 89 | 5 | 4 | 10 | 9 | 5 | 3 | 5 | 3 | 1 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | |
| <i>Ce. cellulans</i> 16259 | 21 | 35 | 9 | 100 | 19 | 61 | 9 | 14 | 34 | 47 | 22 | 41 | 35 | 22 | 18 | 49 | 94 | 84 | 32 | |
| <i>Ce. cellulans</i> 16238 | 22 | 33 | 12 | 70 | 16 | 51 | 12 | 34 | 38 | 38 | 25 | 32 | 49 | 21 | 11 | 21 | 42 | 51 | 40 | |
| <i>Ce. cellulans</i> 16121 | 21 | 23 | 10 | 43 | 10 | 25 | 9 | 15 | 26 | 33 | 17 | 28 | 25 | 17 | 26 | 62 | 100 | 83 | 40 | |
| <i>Ce. cellulans</i> 16221T | 4 | 25 | 2 | 100 | 5 | 19 | 3 | 3 | 17 | 15 | 6 | 21 | 14 | 7 | 4 | 15 | 30 | 15 | 5 | |
| <i>Ce. fimi</i> 16132 | 19 | 63 | 3 | 38 | 36 | 100 | 7 | 4 | 3 | 3 | 5 | 3 | 4 | 2 | 6 | 6 | 13 | 6 | 7 | |
| <i>Ce. fimi</i> 16239 | 2 | 7 | tr | 7 | 18 | 100 | 75 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | |
| <i>Ce. fimi</i> 16345T | 14 | 17 | 6 | 24 | 10 | 26 | 9 | 10 | 42 | 71 | 43 | 72 | 100 | 61 | 6 | 10 | 30 | 38 | 30 | |
| <i>Ce. flavigena</i> 16263T | 2 | 24 | 2 | 100 | 4 | 8 | 2 | 8 | 40 | 7 | 3 | 18 | 9 | 7 | 11 | 13 | 26 | 12 | 7 | |
| <i>Ce. gelida</i> 16122 | 18 | 12 | 5 | 11 | 3 | 11 | 4 | 91 | 3 | 1 | 3 | 11 | 19 | 11 | 45 | 56 | 82 | 79 | 46 | |
| <i>Ce. gelida</i> 16697T | 10 | 6 | 6 | 18 | 5 | 7 | 4 | 17 | 6 | 10 | 8 | 15 | 9 | 4 | 41 | 100 | 64 | 39 | 7 | |
| <i>Ce. turbata</i> 16346 | 1 | 8 | tr | 35 | 14 | 100 | 24 | tr | 2 | tr | 2 | tr | 1 | tr | tr | 2 | 4 | 5 | 5 | |
| <i>Ce. turbata</i> 16191 | 15 | 23 | 6 | 31 | 5 | 13 | 7 | 9 | 21 | 25 | 11 | 30 | 31 | 6 | 40 | 100 | 97 | 58 | 26 | |
| <i>Ce. turbata</i> 4072T | 23 | 24 | 9 | 54 | 8 | 34 | 9 | 7 | 32 | 26 | 14 | 24 | 32 | 10 | 61 | 57 | 73 | 80 | 30 | |
| <i>Ce. uda</i> 16123 | 4 | 19 | 1 | 63 | 18 | 100 | 22 | 3 | tr | tr | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 5 | 11 | 20 | 5 | |
| <i>Ce. uda</i> 16327T | 4 | 39 | 5 | 22 | 9 | 41 | 15 | 11 | 4 | 3 | 5 | 18 | 11 | 4 | 36 | 42 | 19 | 21 | 12 | |

^a Es wurden nur die Massen mit den höchsten Signalintensitäten angegeben. Bei den folgenden Stämme wurden zusätzliche prominente Signale detektiert: *Ce. gelida* LMG 16122 bei $m/z=1325$ (100%), *Ce. cellulans* LMG 16238 bei $m/z=648$ (100%) und *Ce. turbata* LMG 4072T bei $m/z=1323$ (100%).

^b PA= Phosphatidylsäure

3.5 Die Gattung *Curtobacterium*

Seit der Beschreibung von *Curtobacterium plantarum* (Dunleavy, 1989) umfaßt die Gattung *Curtobacterium* sechs gültig beschriebene Arten. Diese waren alle Gegenstand der hier vorgestellten Studie und wurden durch 15 Stämmen repräsentiert.

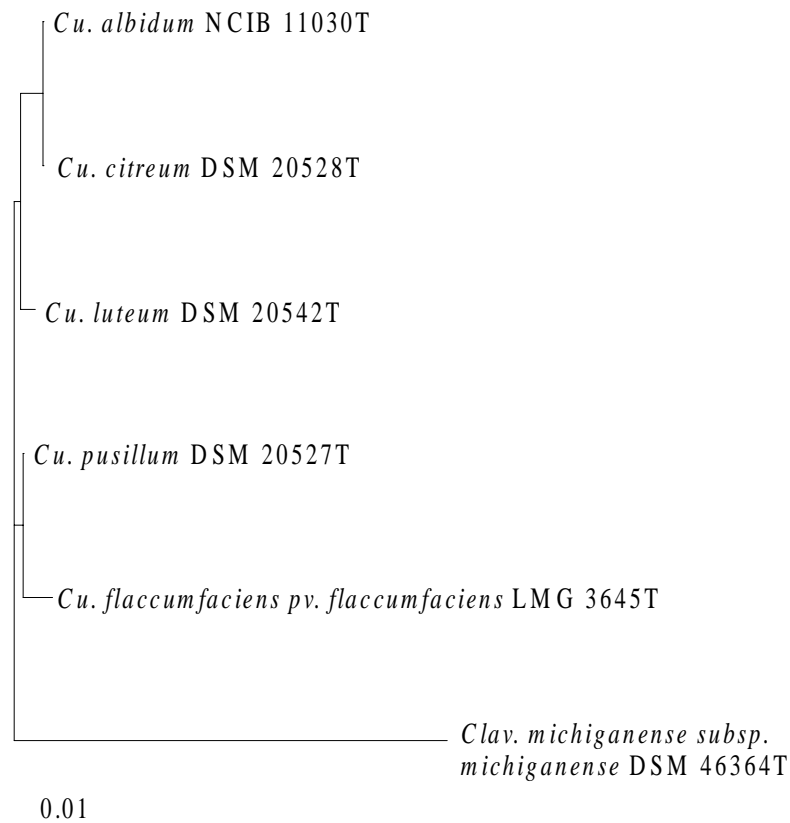


Abb. 3.7: Phylogenetisches Dendrogramm, basierend auf einem Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen der analysierten *Curtobacterium*-Arten. *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* wurde als *outgroup* ausgewählt. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 1%.

Durch die Sequenzierung der Typstämme von *Cu. albidum* NCIB 11030T und *Cu. pusillum* DSM 20527T, die von Dr. M. D. Collins (AFRC Institute of Food Research, Reading, GB) als Kooperationspartner innerhalb des HRAMI-Projektes durchgeführt wurde, konnte die Datenbank für die Gattung *Curtobacterium* erweitert werden. Die hieraus resultierenden phylogenetischen Verhältnisse sind in Abb. 3.7 und Tab. 3.17 dargestellt. Die Ergebnisse dokumentieren die überaus hohen Sequenzähnlichkeiten innerhalb dieser Gattung (99.5-100%). Die beiden Arten *Cu. citreum* und *Cu. albidum* sind aufgrund der Basenzusammensetzung der 16S rRNA-Gensequenz nicht voneinander zu unterscheiden. In diesem Bereich müßten weiterführende DNA-DNA-Hybridisierungsstudien zwischen den Typstämmen erfolgen, um die sich hieraus ergebenden taxonomischen Fragen umfassend beantworten zu können.

Tab. 3.17: 16S rRNA-Sequenzähnlichkeiten zwischen den Typstämmen der analysierten *Curtobacterium*-Spezies.

| Organismen | 16S rRNA-Ähnlichkeit | | | |
|------------------------------------|----------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------|
| | <i>Cu. citreum</i> | <i>Cu. albidum</i> | <i>Cu. flaccumf. pv. flaccumf.</i> | <i>Cu. luteum</i> |
| <i>Cu. albidum</i> | 100 | | | |
| <i>Cu. flaccumf. pv. flaccumf.</i> | 99.2 | 99.2 | | |
| <i>Cu. luteum</i> | 99.5 | 99.6 | 99.4 | |
| <i>Cu. pusillum</i> | 99.6 | 99.5 | 99.6 | 99.6 |

Zusammensetzung der Fettsäuren der polaren Lipidfraktionen

Die Ergebnisse der Analyse der Phospho- und Glykolipidfettsäuren sind in den Tabellen 3.18-3.19 und graphisch als Dendrogramm (Abb. 3.8) dargestellt. Die verschiedenen *Curtobacterium*-Stämme zeigten ein qualitativ recht einheitliches Bild aus iso- und anteiso-verzweigten sowie unverzweigten, gesättigten Fettsäuren (15:0a (6-33%), 16:0i (3-20%), 16:0 (5-23%) und 17:0a (16-51%)). Weiterhin wurden in den Stämmen *Cu. flaccumfaciens pv. betae* LMG 3596T, *Cu. flaccumfaciens pv. oortii* LMG 3704 und *Cu. pusillum* LMG 8788T hohe Anteile (25-61%) einer zweifach-ungesättigten Fettsäure (18:2ω6,9) detektiert. In den Stämmen *Cu. flaccumfaciens pv. betae* LMG 7241, *Cu. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* LMG 3645, *Cu. flaccumfaciens pv. oortii* LMG 3702 und *Cu. luteum* konnten zusätzlich 18:1-Fettsäuren zu einem erheblichen Prozentsatz (22-37%) nachgewiesen werden. Durch Sequenzierung wurde überprüft, ob sich die Abweichungen im Fettsäuremuster auf Fehlidentifizierungen zurückführen ließen. Hierbei wurden mit Ausnahme der beiden *Cu. pusillum*-Stämme jedoch sehr hohe Sequenzähnlichkeiten zu den Typstämmen erhalten (nahezu 100%). *Cu. pusillum* LMG 8788T zeigte eine Ähnlichkeit zu dem entsprechenden Typstamm der DSMZ von 98.7%. Dieser Wert scheint unter Berücksichtigung der ansonsten sehr hohen Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Gattung *Curtobacterium* relativ gering zu sein und könnte somit eine Erklärung für die abweichende Fettsäurezusammensetzung liefern. Diesbezüglich müßten jedoch weiterführende Studien erfolgen. Der zweite analysierte Stamm konnte der Gattung *Bacillus* zugeordnet werden. Er wies eine Sequenzähnlichkeit von 97% zu *Bacillus pumilus* auf.

Tab. 3.18: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen der analysierten *Curtobacterium*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1ω8i | 18:2ω6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|------------------------------|---------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|---------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| <i>Cu. albidum</i> | 8759T | - ^d | - | - | 24.1 | - | 16.5 | - | 8.4 | - | 51.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. citreum</i> | 16240 | - | - | - | 31.5 | - | 13.4 | - | 4.8 | - | 50.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. citreum</i> | 8786T | tr ^c | 1.9 | 1.1 | 13.8 | 1.1 | 12.9 | tr | 11.0 | 1. | 43.1 | 1.3 | - | - | tr | - | 2.3 | - | tr | tr |
| <i>Cu. flacc. pv. betae</i> | 3596T | - | - | - | 29.3 | - | 13.1 | - | 10.5 | - | 22.3 | - | - | 24.8 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. betae</i> | 7241 | tr | 5.7 | 1.2 | 24.7 | tr | 15.6 | - | 13.4 | tr | 15.9 | - | - | - | 21.9 | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. flacc.</i> | 3645T | tr | tr | tr | 10.5 | tr | 11.4 | - | 6.2 | tr | 26.5 | tr | - | - | 37.0 | - | tr | - | tr | - |
| <i>Cu. flacc. pv. flacc.</i> | 3650 | tr | 1.4 | 1.7 | 33.0 | tr | 14.2 | tr | 6.1 | tr | 42.7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. oortii</i> | 3702T | tr | 3.3 | 1.4 | 23.1 | tr | 9.9 | - | 10.2 | tr | 25.1 | tr | - | - | 23.3 | - | tr | - | tr | - |
| <i>Cu. flacc. pv. oortii</i> | 3704 | tr | 3.1 | 1.2 | 18.8 | tr | 9.3 | - | 11.0 | tr | 24.8 | tr | - | 27.2 | - | - | tr | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. pois.</i> | 3710 | tr | tr | 5.6 | 55.1 | - | 3.6 | - | 4.7 | 3.1 | 24.3 | - | - | - | tr | - | tr | - | 1.3 | - |
| <i>Cu. flacc. pv. pois.</i> | 3715T | - | tr | 1.5 | 28.2 | - | 17.5 | - | 5.0 | tr | 45.7 | - | - | tr | - | - | tr | - | - | - |
| <i>Cu. luteum</i> | 8787T | tr | tr | tr | 27.6 | - | 20.2 | - | 4.8 | tr | 25.4 | - | - | - | 18.6 | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. pusillum</i> | 8788T | - | - | tr | 5.9 | tr | 2.6 | - | 3.2 | tr | 16.0 | tr | - | 61.2 | - | - | tr | - | - | - |
| <i>Cu. pusillum</i> | 8812 | 1.3 | 3.1 | 22.0 | 17.4 | 1.4 | 4.3 | tr | 23.4 | 12.7 | 5.6 | tr | - | - | tr | tr | 4.6 | - | tr | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.19: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen der analysierten *Curtobacterium*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2w6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1w8 | C19:0 |
|------------------------------|---------|----------------|-------|------|-----------------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|---------|-------|
| <i>Cu. albidum</i> | 8759T | - ^d | - | 1.3 | tr ^c | 10.1 | tr | 10.9 | - | 7.8 | 2.3 | 48.7 | - | tr | 1.7 | tr | 2.3 | - | 8.6 | - | 1.1 | - |
| <i>Cu. citreum</i> | 16240 | - | - | - | - | 20.3 | - | 15.1 | - | 7.6 | - | 57.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. citreum</i> | 8786T | - | tr | 1.1 | 1.5 | 20.1 | tr | 17.1 | - | 13.3 | 1.0 | 43.6 | - | - | - | tr | - | - | tr | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. beate</i> | 3596T | - | tr | 1.3 | 1.7 | 31.7 | tr | 12.6 | - | 14.1 | tr | 14.0 | - | tr | - | - | 21.6 | - | 1.1 | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. beate</i> | 7241 | - | tr | 3.4 | tr | 16.1 | tr | 14.8 | - | 34.5 | tr | 10.3 | - | - | - | - | 18.8 | - | tr | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. flacc.</i> | 3645 | - | tr | 1.5 | tr | 16.0 | tr | 14.1 | - | 10.6 | tr | 20.6 | - | 1.1 | 1.0 | - | 22.4 | - | 3.0 | - | tr | tr |
| <i>Cu. flacc. pv. flacc.</i> | 3650 | - | - | tr | 1.4 | 24.4 | - | 14.3 | - | 8.1 | tr | 50.1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. oortii</i> | 3702 | - | tr | 2.7 | 1.3 | 20.4 | tr | 10.8 | - | 16.3 | tr | 22.7 | - | tr | tr | tr | 21.7 | - | tr | - | tr | - |
| <i>Cu. flacc. pv. oortii</i> | 3704 | - | tr | 2.2 | 1.1 | 16.4 | tr | 9.5 | - | 18.1 | tr | 22.6 | - | tr | tr | 22.7 | - | - | 2.6 | - | tr | - |
| <i>Cu. flacc. pv. poins.</i> | 3710 | - | - | - | 4.0 | 41.5 | - | 4.4 | - | 3.6 | 2.5 | 44.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. flacc. pv. poins.</i> | 3715 | - | - | - | tr | 6.3 | - | 15.8 | - | 8.0 | 1.3 | 57.8 | - | - | 5.3 | - | - | - | 4.5 | - | tr | - |
| <i>Cu. luteum</i> | 8787T | - | tr | - | 1.2 | 47.5 | - | 16.3 | - | tr | tr | 14.7 | - | - | tr | - | 18.7 | - | - | - | - | - |
| <i>Cu. pusillum</i> | 8788T | 1.7 | tr | 4.8 | 1.3 | 14.3 | tr | 3.9 | - | 6.4 | tr | 10.3 | - | tr | - | 46.4 | - | - | 1.6 | - | - | - |
| <i>Cu. pusillum</i> | 8812 | - | tr | 2.0 | 17.2 | 15.8 | tr | 4.4 | tr | 27.4 | 14.0 | 6.7 | - | tr | - | tr | tr | - | 6.2 | - | tr | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

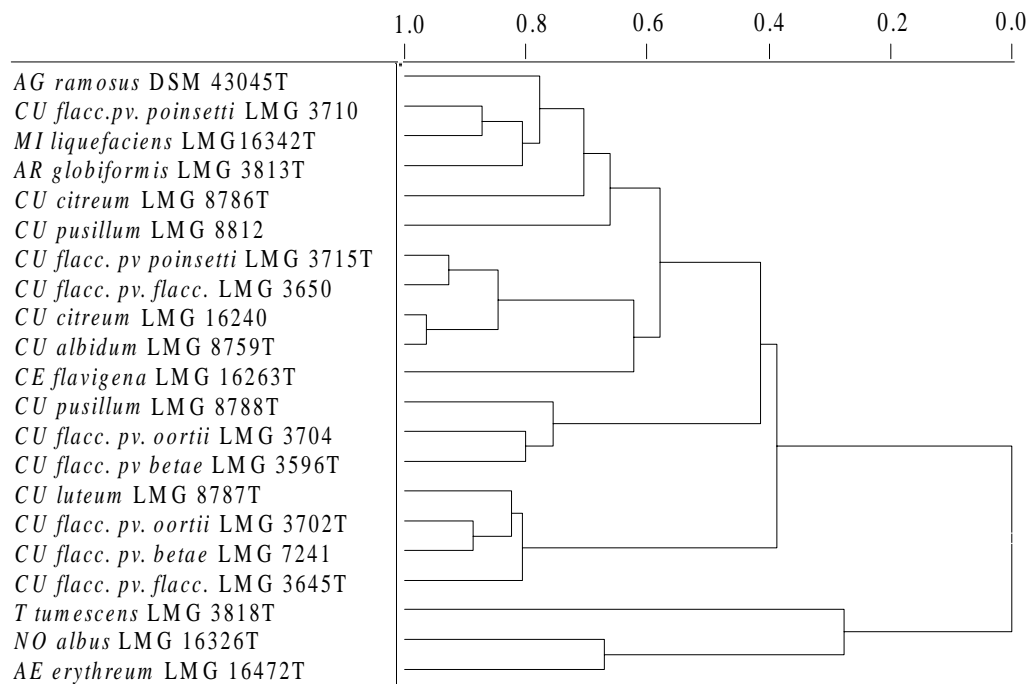


Abb. 3.8: Dendrogramm, welches die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der analysierten Stämme der Gattung *Curtobacterium*, basierend auf den Fettsäuren der Phospholipide, zeigt.

Zusammensetzung der intakten polaren Lipide

Die intakten Phospholipide setzten sich bei den untersuchten Vertretern der Gattung *Curtobacterium* ausschließlich aus Phosphatidylglycerinen und Cardiolipinen zusammen (Tab. 3.20). Charakteristisch für die Gattung scheint die Zusammensetzung der Phosphatidylglycerine aus Verbindungen mit $m/z=694, 708, 722$ und 736 zu sein, wobei $m/z=721$ in nahezu allen Fällen die Hauptkomponente darstellt. Bei den Cardiolipinen herrschten Verbindungen mit $m/z=1338$ vor. Eine Einteilung auf Artebene ist bei der Gattung *Curtobacterium* anhand der Zusammensetzung der Phospholipidfraktionen nicht möglich.

Tab. 3.20: Prozentuale Anteile der massenspektroskopisch analysierten intakten Phospholipide aus Stämmen der Gattung *Curtobacterium*. Der Peak mit der höchsten Signalintensität wurde auf 100% normiert.

| Lipidtyp | Molekulare Masse | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|--------------|------|
| | 694 | 708 | 720 | 722 | 734 | 736 | 748 | 1310 | 1324 | 1338 | 1352 |
| | ← | Phosphatidylglycerine | | | | | | → | ← | Cardiolipine | → |
| <i>Cu. albidum</i> 8759T | 7 | 46 | 15 | 100 | 4 | 27 | 3 | 1 | 3 | 8 | 7 |
| <i>Cu. citreum</i> 16240 | 4 | 34 | 14 | 100 | 2 | 16 | 2 | tr | tr | 2 | 2 |
| <i>Cu. citreum</i> 8786T | 9 | 51 | 15 | 100 | 7 | 37 | 4 | 1 | 3 | 3 | 4 |
| <i>Cu. flacc. pv. betae</i> 3596T | 55 | 69 | 39 | 100 | 30 | 15 | 19 | 9 | 11 | 7 | 7 |
| <i>Cu. flacc. pv. betae</i> 7241 | 32 | 84 | 36 | 100 | 66 | 27 | 52 | 19 | 23 | 24 | 17 |
| <i>Cu. flacc. pv. flacc.</i> 3645T | 20 | 50 | 34 | 100 | 45 | 23 | 97 | 3 | 5 | 7 | 5 |
| <i>Cu. flacc. pv. flacc.</i> 3650 | 11 | 25 | 14 | 100 | 6 | 22 | 2 | 2 | 7 | 7 | 9 |
| <i>Cu. flacc. pv. oortii</i> 3702T | 21 | 54 | 31 | 100 | 26 | 18 | 66 | 7 | 10 | 10 | 8 |
| <i>Cu. flacc. pv. oortii</i> 3704 | 22 | 61 | 42 | 98 | 42 | 26 | 100 | 1 | 2 | 3 | 2 |
| <i>Cu. flacc. pv. poins.</i> 3710 | 100 | 26 | 14 | 81 | 6 | 7 | 4 | 9 | 18 | 6 | 8 |
| <i>Cu. flacc. pv. poins.</i> 3715T | 13 | 28 | 14 | 100 | 8 | 50 | 5 | 3 | 9 | 14 | 14 |
| <i>Cu. luteum</i> 8787T | 26 | 94 | 30 | 100 | 36 | 18 | 50 | 2 | 3 | 3 | 2 |
| <i>Cu. pusillum</i> 8788T | 33 | 21 | 37 | 70 | 13 | 8 | 100 | tr | tr | tr | tr |
| <i>Cu. pusillum</i> 8812 | 42 | 100 | 13 | 79 | 5 | 25 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 |

3.6 Die Gattung *Nocardioides*

Die Gattung *Nocardioides* wurde 1976 von Prauser für Gram-positive, aerobe und mesophile nocardioforme Actinomyceten eingeführt, die ein Myzel bilden, welches in unregelmäßige stäbchen- und kokkenförmige Fragmente zerfällt. Die Typart dieser Gattung ist *Nocardioides albus*. Die Gattung umfaßt derzeit 5 gültig beschriebene Arten, die alle Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren.

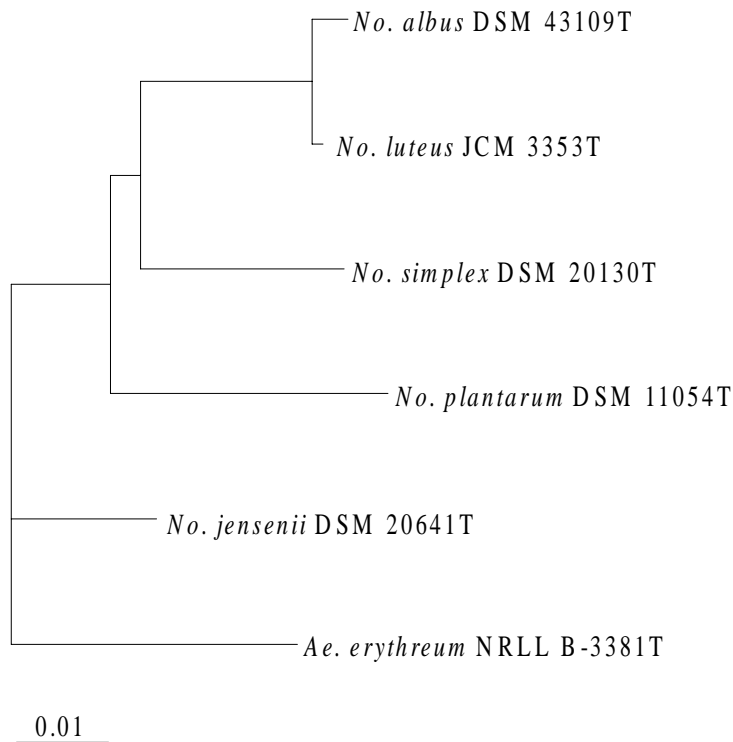


Abb. 3.9: Phylogenetisches Dendrogramm, basierend auf einem Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen der analysierten *Nocardioides*-Arten. *Aeromicrobium erythreum* wurde zusätzlich dargestellt, um die Verhältnisse innerhalb der Gattung *Nocardioides* zu verdeutlichen. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 1%.

Die Sequenzen der Typstämme wurden von den allgemein zugänglichen Datenbanken heruntergeladen und miteinander verglichen (Abb. 3.9 und Tab. 3.21). Insgesamt waren die erhaltenen Sequenzähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Arten der Gattung *Nocardioides* mit $93.9 \pm 1\%$ als eher gering einzuschätzen. Hierbei bildeten die beiden Arten *No. albus* und *No. luteus* eine Ausnahme, welche eine Sequenzähnlichkeit von 98.9% verbindet.

Tab. 3.21: 16S rRNA-Sequenzähnlichkeiten zwischen den Typstämmen der analysierten *Nocardioides*-Spezies.

| Organismen | 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit | | | |
|----------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| | <i>No. albus</i> | <i>No. jensenii</i> | <i>No. luteus</i> | <i>No. plantarum</i> |
| <i>No. jensenii</i> | 94.4 | | | |
| <i>No. luteus</i> | 98.9 | 94.5 | | |
| <i>No. plantarum</i> | 92.4 | 91.9 | 92.9 | |
| <i>No. simplex</i> | 94.3 | 93.9 | 94.7 | 92.5 |

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Die untersuchten Stämme der Gattung *Nocardioides* zeigten ein komplex zusammengesetztes Profil aus iso-, anteiso-verzweigten und unverzweigten Fettsäuren sowie der Tuberculostearinsäure (TBSA). Charakteristisch ist eine Kombination aus großen Anteilen an 16:0i, 17:0 und 18:0, geringen Mengen an 15:0a und 17:0a bei gleichzeitiger Anwesenheit von TBSA. Wie den Tabellen 3.22-3.23 und der Abb. 3.10 zu entnehmen ist, waren die stammspezifischen Variationen in der Fettsäurezusammensetzung relativ gering, so daß eine nahezu vollständige Trennung der Spezies-Cluster erreicht wurde. Die größten Ähnlichkeiten traten parallel zu den phylogenetischen Verhältnissen zwischen den Arten *No. albus* und *No. luteus* auf. Auffällig verhielten sich die drei Stämme *No. plantarum* LMG 16210T, *No. simplex* LMG 16260 und *No. simplex* LMG 3810. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß bereits frühere taxonomische Analysen eine engere Verwandtschaft von *No. simplex* ATCC 13260 (=LMG 16260) zur Gattung *Rhodococcus* und hierbei insbesondere *Rhodococcus erythropolis* ergeben hatten als zum Typstamm von *No. simplex* (Yoon et al., 1997). Dieses Ergebnis wurde durch das hier analysierte Fettsäuremuster unterstützt. Die Sequenzierungen der 16S rDNA von *No. plantarum* LMG 16210T und *No. simplex* LMG 3810 ergaben, daß die beiden Stämme die engste Verwandtschaft zu *Micrococcus lylae* DSM 20315T (Sequenzähnlichkeit 97.1%) bzw. *Arthrobacter oxydans* DSM 20119T (98.6%) aufwiesen. Dies erklärt die wesentlich höheren Anteile dieser Stämme an 15:0i, 15:0a, 17:0a und vor allem das Fehlen von 18:0 und TBSA.

Tab. 3.22: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen der analysierten *Nocardioide*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1 ω 8i | 18:2 ω 6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1 ω 8 | 19:0 |
|--------------------------------------|---------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------------------|-------------------|------|------|------|------------|-----------------|------|
| <i>No. albus</i> | 16212 | - ^d | - | 3.2 | - | 3.8 | 29.8 | - | 12.3 | 3.3 | 4.6 | 21.3 | - | - | - | - | 21.8 | - | - | - |
| <i>No. albus</i> | 16213 | - | - | 3.5 | - | 4.4 | 23.7 | 1.5 | 10.3 | 2.8 | 5.0 | 24.4 | 1.6 | - | 3.3 | - | 17.0 | 2.6 | - | - |
| <i>No. albus</i> | 4080 | tr ^c | tr | 3.3 | tr | 1.4 | 25.8 | 6.1 | 7.8 | 3.3 | 7.2 | 6.6 | - | - | 19.2 | 2.4 | 6.9 | 2.7 | tr | tr |
| <i>No. albus</i> | 16326T | - | - | - | - | 2.5 | 13.3 | - | 10.5 | - | 2.5 | 27.4 | - | - | 2.9 | - | 33.6 | 4.4 | - | 2.8 |
| <i>No. jensenii</i> | 16325T | - | tr | 6.6 | tr | tr | 9.9 | 1.7 | 4.2 | 17.7 | 8.5 | 8.6 | 2.0 | tr | 22.6 | 1.8 | 5.1 | 3.5 | 1.8 | tr |
| <i>No. luteus</i> | 16160T | - | - | - | - | - | 41.0 | - | 11.4 | - | 5.5 | 10.9 | - | - | - | - | 25.5 | 5.7 | - | - |
| <i>No. luteus</i> | 16209 | - | - | - | - | - | 41.7 | - | 11.0 | - | 5.5 | 15.3 | - | - | - | - | 22.5 | 4.0 | - | - |
| <i>No. plantarum</i> | 16210T | 1.2 | 1.2 | 16.1 | 50.8 | tr | 7.0 | - | 2.6 | 1.4 | 19.1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| " <i>No. simplex</i> " ^{re} | 16260 | - | 3.5 | - | tr | 1.3 | - | 7.5 | 19.0 | tr | 1.4 | 2.6 | 1.7 | - | 9.9 | 2.6 | 3.6 | 31.3 | 6.1 | tr |
| <i>No. simplex</i> | 16261T | tr | tr | 1.5 | tr | tr | 20.9 | tr | 9.8 | 6.9 | tr | 3.3 | 1.9 | - | 1.5 | tr | 18.0 | 29.8 | tr | tr |
| <i>No. simplex</i> | 3810 | tr | tr | 3.3 | 37.5 | tr | 5.2 | tr | 14.8 | 1.9 | 29.8 | - | - | - | tr | - | 1.9 | - | tr | 2.3 |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1 ω 7, t16:1 ω 7 und 16:1 ω 9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1 ω 9/18:1 ω 6 (ECL 17.753). sum3 = c18:1 ω 7/t18:1 ω 9/t18:1 ω 12/c18:1 ω 9 (ECL 17.798)

^c tr (traces). Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

^e "*No. simplex*" LMG 16260 wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit zu *Rhodococcus erythropolis* umgruppiert.

Tab. 3.23: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen der analysierten *Nocardioides*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2w6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1w8 | C19:0 |
|-------------------------------------|---------|-----------------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|---------|-------|
| <i>No. albus</i> | 16212 | - ^d | - | 2.8 | - | - | 3.4 | 30.5 | - | 15.1 | 4.0 | 4.6 | - | 18.0 | - | - | 4.0 | - | 17.6 | - | - | - |
| <i>No. albus</i> | 16213 | tr ^c | tr | 2.3 | 2.1 | tr | 3.5 | 17.9 | tr | 12.9 | 2.5 | 3.1 | tr | 21.9 | tr | tr | 4.8 | tr | 19.8 | 1.3 | tr | 1.5 |
| <i>No. albus</i> | 4080 | - | 2.3 | 2.1 | 15.2 | 57.9 | tr | 7.8 | - | 3.0 | tr | 9.1 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | - | - |
| <i>No. albus</i> | 16326T | tr | tr | 4.9 | tr | tr | 2.0 | 16.1 | tr | 13.5 | 1.8 | 1.0 | - | 15.6 | 1.3 | tr | 8.9 | tr | 21.5 | 4.3 | 1.2 | 1.5 |
| <i>No. jensenii</i> | 16325T | tr | tr | 6.4 | 7.3 | tr | tr | 8.3 | 1.1 | 11.5 | 14.8 | 5.2 | - | 7.3 | tr | tr | 18.3 | 1.8 | 7.2 | 1.8 | 1.2 | tr |
| <i>No. luteus</i> | 16160T | - | tr | 2.8 | tr | tr | tr | 29.2 | tr | 15.1 | 1.8 | tr | - | 9.2 | 1.4 | tr | 5.3 | tr | 24.3 | 3.1 | tr | tr |
| <i>No. luteus</i> | 16209 | - | - | 6.4 | - | - | - | 29.4 | - | 20.3 | - | 4.2 | - | 12.9 | - | - | 5.5 | - | 21.3 | - | - | - |
| <i>No. plantarum</i> | 16210T | - | tr | tr | 14.9 | 44.8 | tr | 7.7 | - | 3.0 | 2.3 | 23.0 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | - | tr |
| " <i>No. simplex</i> " ^e | 16260 | 1.7 | - | 17.0 | - | tr | tr | - | tr | 35.1 | - | - | - | tr | - | 2.1 | 17.8 | 1.1 | 11.4 | 2.4 | tr | tr |
| <i>No. simplex</i> | 16261T | 4.1 | tr | 18.8 | tr | tr | tr | 6.4 | - | 25.5 | 2.5 | tr | tr | 1.7 | tr | 1.2 | 12.1 | tr | 14.2 | 5.3 | tr | tr |
| <i>No. simplex</i> | 3810 | 3.2 | tr | 1.9 | 2.9 | 35.7 | tr | 4.2 | tr | 6.8 | 2.0 | 37.6 | - | - | tr | - | tr | - | 1.5 | - | tr | 1.4 |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

^e "*No. simplex*" LMG 16260 wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit zu *Rhodococcus erythropolis* umgruppiert.

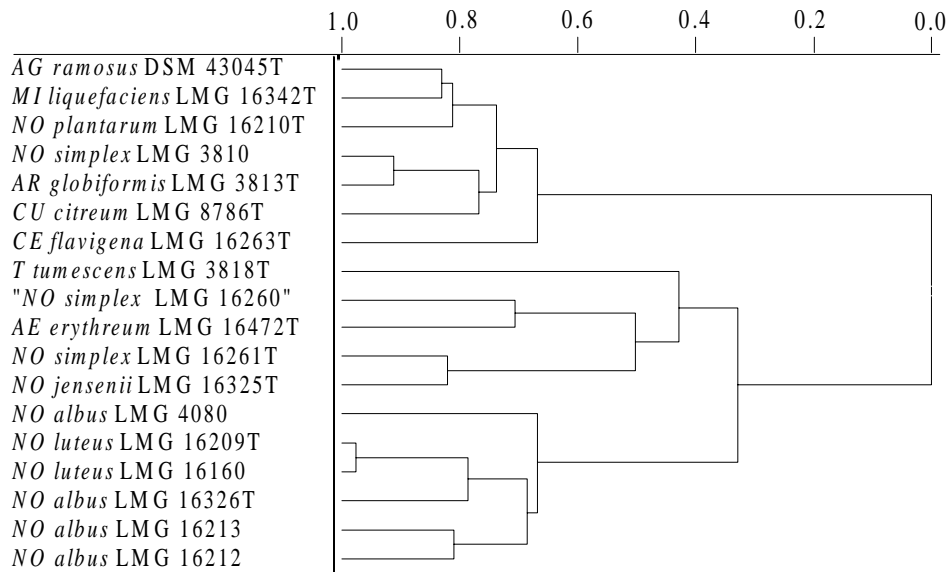


Abb. 3.10: Dendrogramm, basierend auf einem Vergleich der Phospholipidfettsäuren verschiedener *Nocardioide*-Stämme. Clusterverfahren: Incremental.

Zusammensetzung der intakten polaren Lipide

Die in Tab. 3.24 zusammengefaßten Ergebnisse der massenspektroskopisch analysierten intakten Phospholipide belegen, daß in den *Nocardioide*-Stämmen eine große Variation von Phosphatidylglycerinen detektiert wurde. Zusätzlich wurden geringe Signalintensitäten für Phosphatidylinositole beobachtet. Die falsch identifizierten Stämme *No. plantarum* LMG 16210T und *No. simplex* LMG 3810 fielen auch beim Vergleich der intakten Phospholipidspektren auf. Sie wichen durch die verminderte Anzahl von Phosphatidylglycerinen (Hauptanteile von $m/z = 694$ und 722) und die Anwesenheit von Cardiolipinen von dem für die Gattung *Nocardioide* typischen Muster ab.

Tab. 3.24: Massenspektroskopisch analysierte intakte Phospholipide aus *Nocardioide*-Stämmen. Der Peak mit der höchsten Signalintensität wurde auf 100% normiert.

| Lipidtyp | Molekulare Masse ^a | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | 694 | 708 | 720 | 722 | 734 | 736 | 748 | 750 | 762 | 764 | 838 | 852 | |
| | Phosphatidylglycerine | | | | | | | | | | | | |
| | ← | | | | | | | | | → | ← | PI | → |
| <i>No. albus</i> 16212 | 8 | 29 | 14 | 63 | 20 | 100 | 20 | 98 | 11 | 42 | 4 | 5 | |
| <i>No. albus</i> 16213 | 10 | 26 | 20 | 56 | 35 | 97 | 37 | 100 | 22 | 53 | 14 | 9 | |
| <i>No. albus</i> 4080 | 100 | 42 | 7 | 42 | 1 | 4 | 1 | 4 | tr | 2 | tr | tr | |
| <i>No. albus</i> 16326T | 1 | 10 | 8 | 32 | 16 | 69 | 19 | 100 | 19 | 90 | 8 | 11 | |
| <i>No. jensenii</i> 16325T | 4 | 16 | 32 | 92 | 76 | 90 | 100 | 100 | 89 | 49 | 14 | 9 | |
| <i>No. luteus</i> 16160T | 4 | 18 | 10 | 50 | 13 | 61 | 17 | 100 | 8 | 34 | 8 | 7 | |
| <i>No. luteus</i> 16209 | 4 | 27 | 11 | 53 | 12 | 82 | 15 | 100 | 7 | 24 | 2 | 3 | |
| <i>No. plantarum</i> 16210T | 100 | 39 | 13 | 94 | 3 | 5 | 3 | 8 | 1 | 2 | 2 | 1 | |
| " <i>No. simplex</i> " 16260 | 7 | 7 | 9 | 8 | 14 | 8 | 24 | 10 | 19 | 9 | 7 | 9 | |
| <i>No. simplex</i> 16261T | 4 | 6 | 9 | 21 | 11 | 29 | 29 | 79 | 28 | 100 | 28 | 33 | |
| <i>No. simplex</i> 3810 | 38 | 84 | 24 | 100 | 9 | 16 | 9 | 11 | 7 | 10 | 13 | 10 | |

^a Es wurden nur die Massen mit den höchsten Signalintensitäten angegeben. Bei *No. plantarum* LMG 16210T wurden zusätzlich prominente Signale für Cardiolipine bei $m/z = 1296$ (12%), 1310 (13%), 1324 (15%), 1338 (12%) und 1352 (12%) detektiert.

3.7 Die Gattung *Agromyces*

Die Gattung *Agromyces* wurde ursprünglich allein für die Art *Ag. ramosus*, ein filamentös verzweigter Actinomycet ohne Katalase-Aktivität, geschaffen (Gledhill und Casida, 1969). Später wurde die Beschreibung der Gattung um Spezies mit Katalase-Aktivität erweitert und enthält heute vier gültig beschriebene Arten mit *Ag. ramosus* als Typart. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zehn verschiedene Stämme der Gattung *Agromyces* untersucht, die drei Arten angehörten. Die Berechnung der 16S rRNA/DNA-Sequenzähnlichkeiten erfolgte unter Verwendung von Datenbanken entnommenen Sequenzen. Die Resultate sind in Tab. 3.25 zusammengefaßt. Es ergaben sich Sequenzähnlichkeiten von $98.4 \pm 0.6\%$.

Tab. 3.25: 16S rRNA-Sequenzähnlichkeiten zwischen den Typstämmen der analysierten *Agromyces*-Spezies.

| Organismen | 16S rRNA - Ähnlichkeit | |
|--------------------|------------------------|--------------------|
| | <i>Ag. ramosus</i> | <i>Ag. cerinus</i> |
| <i>Ag. cerinus</i> | 98.9 | |
| <i>Ag. fucosus</i> | 97.5 | 98.7 |

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Die Ergebnisse der Analyse der Fettsäuren der polaren Lipidfraktionen aller untersuchten *Agromyces*-Stämme sind den Tab. 3.26-3.27 zu entnehmen. Zusätzlich wurde aufgrund der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide ein Dendrogramm berechnet (Abb. 3.11).

Die Stämme zeigten ein qualitativ und auch quantitativ einheitliches Fettsäureprofil, bestehend aus iso- und anteiso-verzweigten sowie in geringeren Anteilen unverzweigten Säuren. Die Fettsäuremuster der Phospho- und Glykolipide waren dabei sehr ähnlich aus 15:0i (3-10%), 15:0a (21-38%), 16:0i (9-15%), 16:0 (<4%), 17:0i (<5%) und 17:0a (36-56%) zusammengesetzt. Die Hauptanteile wurden somit von 15:0a, 16:0i und 17:0 gestellt.

Bei der Analyse der Ergebnisse fiel der Stamm *Ag. ramosus* LMG 16680T durch seine starken Abweichungen von dem ansonsten harmonischen Bild der Fettsäureprofile auf. Auch die Auftrennung der Gesamtzellproteine der verschiedenen *Agromyces*-Spezies ergab für diesen Stamm ein divergentes Muster (Dr. M. Tesar, GBF, AG Mikrobielle Ökologie, unveröffentlicht). Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Stamm *Ag. ramosus* DSM 43045T in die Studie miteinbezogen. Dieser Stamm zeigte das typische Fettsäureprofil und gab weitere Hinweise darauf, daß es sich bei *Ag. ramosus* LMG 16680T um einen falsch identifizierten Stamm handelte. Eine endgültige Klärung dieser Frage konnte nicht erzielt werden, da trotz intensiver Bemühungen kein PCR-Produkt der 16S rDNA dieses Stammes erhalten wurde und somit keine Sequenzierungsreaktion möglich war.

Tab. 3.26: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen der analysierten *Agromyces*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr, | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1 ω 8i | 18:2 ω 6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1 ω 8 | 19:0 |
|------------------------------|------------|-----------------|----------------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------------------|-------------------|------|------|------|------------|-----------------|------|
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> | 16155T | tr ^c | - ^d | 6.1 | 29.5 | - | 10.1 | - | 1.4 | 4.2 | 47.9 | - | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> | 16586 | - | - | 6.7 | 31.8 | - | 9.1 | - | 3.0 | 2.4 | 41.6 | - | - | - | tr | - | 2.2 | - | - | - |
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> | 16587 | tr | - | 2.7 | 30.8 | - | 10.2 | - | 2.8 | 1.8 | 49.9 | - | - | - | tr | - | 1.1 | - | tr | - |
| <i>Ag. cer. subsp. nitr.</i> | 16157 | tr | - | 3.7 | 37.4 | - | 14.8 | - | 3.8 | 1.5 | 34.0 | - | - | - | tr | tr | tr | - | - | tr |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> | 16156T | tr | - | 3.2 | 38.2 | - | 15.7 | - | tr | 1.2 | 39.6 | - | - | - | - | - | tr | tr | - | - |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> | 16588 | tr | - | 9.7 | 36.4 | - | 14.0 | - | 2.5 | 3.1 | 33.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> | 16589 | - | - | 2.5 | 21.0 | - | 15.4 | - | 1.9 | 2.6 | 55.8 | - | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ag. fuc. subsp. hipp.</i> | 16158T | tr | - | 6.4 | 34.8 | - | 11.7 | - | 1.7 | 2.3 | 41.0 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ag. ramosus</i> | DSM 43045T | - | - | 7.2 | 29.5 | - | 9.4 | tr | 1.4 | 4.3 | 42.1 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ag. ramosus</i> | 16680T | - | tr | 1.5 | 7.3 | - | 3.2 | tr | 20.9 | 1.9 | 15.7 | tr | - | 8.7 | 20.3 | tr | 15.9 | - | - | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben,

^b Die Fettsäuren c16:1 ω 7, t16:1 ω 7 und 16:1 ω 9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1 ω 9/18:1 ω 6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1 ω 7/t18:1 ω 9/t18:1 ω 12/c18:1 ω 9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.27: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen der analysierten *Agromyces*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2w6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1w8 | C19:0 |
|------------------------------|---------------|-----------------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|---------|-------|
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> | 16155T | - ^d | tr | - | 5.5 | 25.7 | - | 6.9 | - | 1.1 | 8.1 | 51.0 | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> | 16586 | tr ^c | tr | tr | 2.4 | 29.5 | - | 8.7 | - | 2.8 | 3.2 | 49.9 | - | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> | 16587 | - | - | - | 1.4 | 15.1 | - | 8.0 | - | 2.6 | 4.8 | 66.0 | - | - | tr | - | - | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ag. cer. subsp. nitr.</i> | 16157 | - | tr | tr | 3.2 | 33.1 | - | 12.2 | - | 3.1 | 3.3 | 42.6 | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> | 16156T | - | tr | - | 3.1 | 35.4 | - | 9.4 | - | tr | 3.2 | 46.4 | - | - | tr | - | - | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> | 16588 | - | - | tr | 4.1 | 16.0 | - | 9.8 | - | 3.5 | 10.2 | 51.4 | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> | 16589 | - | - | - | 2.5 | 20.8 | - | 10.7 | - | 1.3 | 5.9 | 57.5 | - | - | tr | - | - | - | - | - | tr | - |
| <i>Ag. fuc. subsp. hipp.</i> | 16158T | - | tr | - | 4.8 | 28.7 | - | 10.0 | - | 1.2 | 5.5 | 47.8 | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| <i>Ag. ramosus</i> | DSM 43045T | 2.4 | - | 1.5 | 5.4 | 23.1 | - | 5.4 | - | 1.8 | 6.5 | 50.1 | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | 1.4 |
| <i>Ag. ramosus</i> | 16680T | 1.3 | - | 1.5 | - | - | tr | - | 1.1 | 15.2 | tr | tr | - | tr | - | 13.5 | 52.9 | 1.1 | 7.5 | - | tr | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

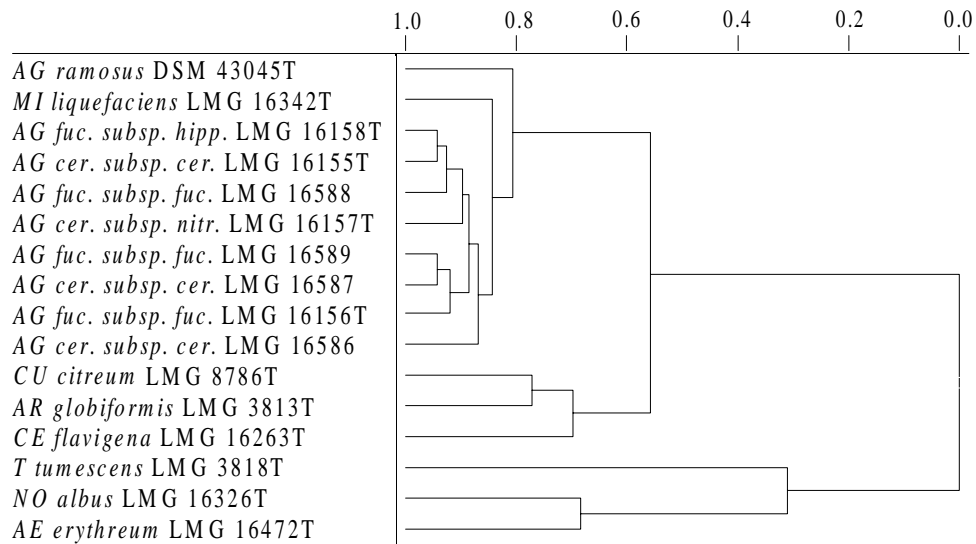


Abb. 3.11: Dendrogramm, welches die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der analysierten Stämme der Gattung *Agromyces*, basierend auf den Fettsäuren der Phospholipide, zeigt.

Zusammensetzung der intakten polaren Lipide

Auch bei der Zusammensetzung der polaren Lipide zeigten die *Agromyces*-Stämme ein sehr einheitliches Bild, bestehend aus einer relativ kleinen Anzahl verschiedener Phosphatidylglycerine und Cardiolipine. Bei allen Stämmen wurde die höchste Signalintensität bei $m/z = 722$ detektiert.

Tab. 3.28 Massenspektroskopisch analysierte intakte Phospholipide aus *Agromyces*-Stämmen. Der Peak mit der höchsten Signalintensität wurde 100% gesetzt.

| Lipidtyp | Molekulare Masse | | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------|-----|-----|-----|------|--------------|------|------|
| | 708 | 720 | 722 | 750 | 1310 | 1324 | 1338 | 1352 |
| | ← | PG | | → | ← | Cardiolipine | | |
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> 16155T | 26 | 13 | 100 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> 16586 | 33 | 11 | 100 | 4 | 2 | 5 | 8 | 8 |
| <i>Ag. cer. subsp. cer.</i> 16587 | 28 | 14 | 100 | 7 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>Ag. cer. subsp. nitr.</i> 16157 | 38 | 12 | 100 | 19 | 2 | 5 | 4 | 3 |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> 16156T | 42 | 12 | 100 | 2 | 3 | 9 | 12 | 12 |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> 16588 | 49 | 15 | 100 | 6 | 1 | 3 | 5 | 5 |
| <i>Ag. fuc. subsp. fuc.</i> 16589 | 41 | 14 | 100 | 13 | 1 | 6 | 3 | 3 |
| <i>Ag. fuc. subsp. hipp.</i> 16158T | 32 | 14 | 100 | 17 | 2 | 3 | 6 | 8 |
| <i>Ag. ramosus</i> LMG 16680T | 24 | 17 | 100 | 29 | tr | tr | 2 | 3 |
| <i>Ag. ramosus</i> DSM 43045T | 24 | 14 | 100 | 8 | tr | tr | 2 | 4 |

3.8 Die Gattung *Aeromicrobium*

Die Gattung *Aeromicrobium* wurde für asporulente Actinomyceten etabliert, die kein Myzel bilden und LL-Diaminopimelinsäure als Diaminosäure in der Zellwand enthalten (Miller et al., 1991). Sie umfaßt derzeit zwei gültig beschriebene Arten, die beide Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren. *Ae. erythreum* stellt die Typart dieser Gattung dar.

Bei dem Vergleich der aus Datenbanken zugänglichen Sequenzen wiesen die beiden Typstämme von *Aeromicrobium erythreum* NRRL B-3381T und *Aeromicrobium fastidiosum* DSM 10552T eine Sequenzähnlichkeit der 16S rDNA von 98.2% auf.

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Die beiden analysierten Stämme der Gattung *Aeromicrobium* zeigten ein qualitativ einheitliches Muster, bei dem auch die quantitativen Verhältnisse weitgehend übereinstimmten (s. Tab. 3.29-3.30). Beide Arten enthielten signifikante Mengen der unverzweigten, gesättigten Fettsäuren 16:0 (9-30%) und 18:0 (21-37%) sowie an einfach ungesättigten Octadecensäuren (15-29%). Weiterhin wurden Anteile der diagnostisch wichtigen Tuberculostearinsäure detektiert (20-27%).

Zusammensetzung der intakten polaren Lipide

Die intakten Phospholipidfraktionen der beiden analysierten *Aeromicrobium*-Stämme zeichneten sich durch das Auftreten einer geringen Anzahl von Peaks aus. Es wurden neben Phosphatidylglycerinen mit relativ hohen Massen ($m/z= 749$ und 763) Phosphatidylinositole detektiert. Cardiolipine traten in den Spektren dieser Gattung nicht auf.

Tab. 3.29: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen der analysierten *Aeromicrobium*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1ω8i | 18:2ω6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|------------------------|---------|----------------|-----------------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|---------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| <i>Ae. erythreum</i> | 16472T | - ^d | tr ^c | - | - | tr | tr | tr | 30.2 | - | tr | 2.2 | tr | - | 15.4 | tr | 21.3 | 26.5 | tr | - |
| <i>Ae. fastidiosum</i> | 16205T | - | - | - | tr | tr | - | tr | 8.9 | - | tr | 1.1 | - | - | 29.3 | 1.0 | 37.5 | 19.7 | - | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.30: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen der analysierten *Aeromicrobium*-Stämme.^a

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2ω6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1ω8 | C19:0 |
|------------------------|---------|------|----------------|------|-------|-------|-----------------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|---------|-------|
| <i>Ae. erythreum</i> | 16472T | 2.2 | - ^d | 3.3 | - | - | tr ^c | tr | tr | 35.7 | - | tr | - | 2.6 | - | tr | 17.3 | 1.0 | 25.1 | 9.5 | tr | - |
| <i>Ae. fastidiosum</i> | 16205T | 2.3 | - | 5.0 | - | tr | tr | - | tr | 13.9 | - | tr | - | tr | - | tr | 25.5 | tr | 32.4 | 12.5 | tr | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.31: Prozentuale Anteile der massenspektroskopisch analysierten intakten Phospholipide aus Stämmen der Gattung *Aeromicrobium*. Der Peak mit der höchsten Signalintensität wurde auf 100% normiert.

| | Molekulare Masse | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | 690 | 722 | 736 | 748 | 750 | 762 | 764 | 776 | 778 | 790 | 792 | 838 | 850 | 852 | 866 | |
| Lipidtyp | ← | Phosphatidylglycerine | | | | | | | | | | → | ← | PI | | → |
| <i>Ae. erythreum</i> | 24 | 12 | 6 | 31 | 13 | 33 | 77 | 45 | 16 | 22 | 22 | 10 | 26 | 100 | 14 | |
| <i>Ae. fastidiosum</i> | 10 | 20 | 25 | 36 | 100 | 22 | 68 | 11 | 30 | 6 | 12 | 42 | 7 | 25 | 14 | |

3.9 Die Gattung *Terrabacter*

Die Gattung *Terrabacter* wurde 1989 von Collins et al. für die auch heute noch einzig gültig beschriebene Art *Terrabacter tumescens* geschaffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Stämme dieser Art untersucht.

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Die Ergebnisse der Analyse der Fettsäuren der polaren Lipide sind in den Tab. 3.32-3.33 zusammengefaßt. Der Typstamm wies eine komplexe Mischung aus unverzweigten- gesättigten, einfach-ungesättigten sowie auch iso- und anteiso-verzweigten Fettsäuren auf, bei der keine Fettsäure die Hauptkomponente darstellte. Der Stamm *T. tumescens* LMG 16133 zeigte ein vom Typstamm stark abweichendes Muster. Insbesondere die signifikanten Mengen an Tuberculostearinsäure legten die Vermutung einer Fehlidentifizierung nahe, welche durch Sequenzierung der 16S rDNA bestätigt wurde. Diese ergab eine Sequenzähnlichkeit von 99.7% zu *Rhodococcus equi* DSM 20307T.

Zusammensetzung der intakten polaren Lipide

Die elektronische Erfassung der Bestandteile der Phospholipidfraktion war bei *T. tumescens* LMG 3818T nur schwer möglich. Auch nach einer starken Aufkonzentrierung der Probe war die Aufnahme von Spektren schwierig, die eine Auswertung in einer mit anderen Spektren vergleichbaren Form sicherstellten. Die visuelle Auswertung der Spektren ergab, daß dieser Stamm neben Phosphatidylglycerinen und Cardiolipinen unbekannte Verbindungen im Bereich $m/z = 790-840$ enthielt.

Tab. 3.32: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen der analysierten *Terrabacter*-Arten.^a

| Spezies | LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1 ω 8i | 18:2 ω 6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1 ω 8 | 19:0 |
|---------------------|---------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------------------|-------------------|------|------|------|------------|-----------------|------|
| <i>T. tumescens</i> | 16133 | - ^d | 5.5 | - | tr | 2.9 | - | 20.2 | 13.5 | - | tr | 2.5 | 4.3 | tr | 3.3 | 1.1 | 4.4 | 32.7 | 2.7 | tr |
| <i>T. tumescens</i> | 3818T | tr ^c | 1.6 | 5.3 | 1.5 | 1.7 | 2.4 | 4.7 | 9.1 | 1.2 | 1.2 | 4.0 | tr | tr | 11.8 | 1.2 | 6.1 | tr | tr | 1.6 |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Der folgende Stamm enthielt zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: *T. tumescens* (LMG 3818T) enthielt zusätzlich den unbekannten FAME (ECL 16.114) (7.8%), c17:1 ω 7i (5.2%), c17:1 ω 8 (3.5%), t18:1 ω 7/18:1 ω 5 (10.5%) und einen unbekannten FAME (ECL 18.063) (2.0%).

^b Die Fettsäuren c16:1 ω 7, t16:1 ω 7 und 16:1 ω 9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1 ω 9/18:1 ω 6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1 ω 7/t18:1 ω 9/t18:1 ω 12/c18:1 ω 9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.33: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen der analysierten *Terrabacter*-Arten.^a

| Spezies | LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2 ω 6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | C19:1 ω 8 | C19:0 |
|---------------------|---------|------|----------------|------|-------|-----------------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|-------------------|------|------|------|------------|------------------|-------|
| <i>T. tumescens</i> | 16133 | 3.9 | - ^d | 13.1 | - | tr ^c | 2.6 | tr | 7.7 | 23.8 | tr | tr | - | 2.4 | - | tr | 5.9 | tr | 7.2 | 13.9 | 1.1 | tr |
| <i>T. tumescens</i> | 3818T | - | 2.2 | 3.0 | 18.9 | 3.0 | 2.0 | 6.6 | 3.9 | 17.3 | 5.1 | 3.8 | - | 9.5 | tr | tr | 5.4 | tr | 14.4 | tr | tr | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Der folgende Stamm enthielt zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: *T. tumescens* (LMG 16133) enthielt zusätzlich 17:1 ω 7i (8.1%), c18:1 ω 8i (2.1%).

^b Die Fettsäuren c16:1 ω 7, t16:1 ω 7 und 16:1 ω 9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1 ω 6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1 ω 9/18:1 ω 6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1 ω 7/t18:1 ω 9/t18:1 ω 12/c18:1 ω 9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

3.10 Fehlidentifizierungen innerhalb der Referenzstämme

Neben den in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschriebenen Fehlidentifizierungen fielen weitere Stämme durch starke Abweichungen in der Fettsäurezusammensetzung auf. Die detektierten Fettsäureprofile ermöglichten keine Zuordnung zu einer der untersuchten Gattungen. Die phylogenetische Analyse der betreffenden Stämme ergab, daß die abweichenden Fettsäuremuster in allen Fällen auf die Zugehörigkeit zu anderen als den im Rahmen dieser Studie analysierten Gattungen zurückgeführt werden konnten. Die Ergebnisse der 16S rDNA-Sequenzierung sind in Tab. 3.33 zusammengefaßt, in der auch die schon in den einzelnen Kapiteln vorgestellten Stämme noch einmal aufgelistet sind.

Tab. 3.34: Identifizierung von Stämmen mit abweichendem FAME-Profil durch 16S rDNA-Sequenzierung.

| Stamm | LMG-Nr. | Identifizierung durch 16S rDNA Sequenzierung | Ähnlichkeit zu diesem Stamm |
|-----------------------------|--------------------|---|-------------------------------------|
| <i>Ag. ramosus</i> | 16680 ^T | keine Sequenz erhalten | |
| <i>Ar. citreus</i> | 16146 | <i>Ar. sulfureus</i> ^a | 96.1% |
| | | | 91.9% zu <i>Ar. citreus</i> |
| <i>Ar. duodecadis</i> | 16468 ^T | <i>Janibacter limosus</i> ^b | 96.0% |
| | | | 92.1% zu <i>Ar. globiformis</i> |
| <i>Ar. globiformis</i> | 16339 | <i>Ar. ilicis</i> ^a | 98.3% |
| | | | 94.6% zu <i>Ar. globiformis</i> |
| <i>Ar. globiformis</i> | 3820 ^T | <i>Corynebacterium variabilis</i> ^b | 100% |
| <i>Ar. ilicis</i> | 7255 | <i>Cu. luteum</i> ^a | 98.9% |
| | | | 88.8% zu <i>Ar. ilicis</i> |
| <i>Ar. oxydans</i> | 3817 | <i>Ar. nicotinovorans</i> ^b | 99.8% |
| | | | 97.5% zu <i>Ar. oxydans</i> |
| <i>Ar. picolinophilus</i> | 16262 ^T | <i>Rhodococcus erythropolis</i> ^b | 99.7% |
| <i>Ar. polychromogenes</i> | 16309 ^T | <i>Ar. oxydans</i> ^a | 99.6% |
| | | | 98.9% zu <i>Ar. polychromogenes</i> |
| <i>Ar. protophormiae</i> | 16115 | <i>Ar. nicotianae</i> ^a | 97.9% |
| | | | 97.4% <i>Ar. protophormiae</i> |
| <i>Ar. siderocapsulatus</i> | 16118 | <i>Pseudomonas</i> sp. ^c | |
| <i>Ar. siderocapsulatus</i> | 16206 ^T | <i>Pseudomonas</i> sp. ^c | |
| <i>Ar. ureafaciens</i> | 16130 | <i>Ar. histidinolovorans</i> ^b | 99.5% |
| | | | 95.8% zu <i>Ar. ureafaciens</i> |
| <i>Ar. viscosus</i> | 16473 ^T | <i>Rhizobium leguminosarum</i> ^a | 94.5% |
| <i>Mi. terregens</i> | 16258 ^T | <i>Enterococcus faecalis</i> ^a | 94.2% |
| <i>Ce. fimi</i> | 16132 | <i>Ar. nicotinovorans</i> ^a | 97.6% |
| <i>Ce. turbata</i> | 16346 | <i>Mi. liquefaciens</i> ^b | 99.6% |
| <i>Cu. plantarum</i> | 16222 ^T | <i>Erwinia herbicola</i> ^a | 83.1% |
| <i>Cu. pusillum</i> | 8812 | <i>Bacillus pumilus</i> ^a | 97.0% |
| <i>No. plantarum</i> | 16210 ^T | <i>Micrococcus lylae</i> ^a | 97.1% |
| <i>No. simplex</i> | 16260 | <i>Rhodococcus erythropolis</i> ^a | 94.8% |
| <i>No. simplex</i> | 3810 | <i>Ar. oxydans</i> ^a | 98.6% |
| <i>T. tumescens</i> | 16133 | <i>Rhodococcus equi</i> ^a | 99.7% |

^a Bei diesen Stämmen erfolgte die Identifizierung durch Teilsequenzierung der 16S rDNA mit dem Primer 16R518 (Lane et al., 1991).

^b Hierbei erfolgte eine Sequenzierung des nahezu vollständigen 16S rRNA-Gens.

^c Identifizierung aufgrund des Fettsäuremethylesterprofils unter Verwendung der kommerziellen MID-Datenbank (Version 3.9), durchgeführt an der University of Ghent, Belgien.

3.11 Intergattungsspezifische Verwandtschaftsverhältnisse

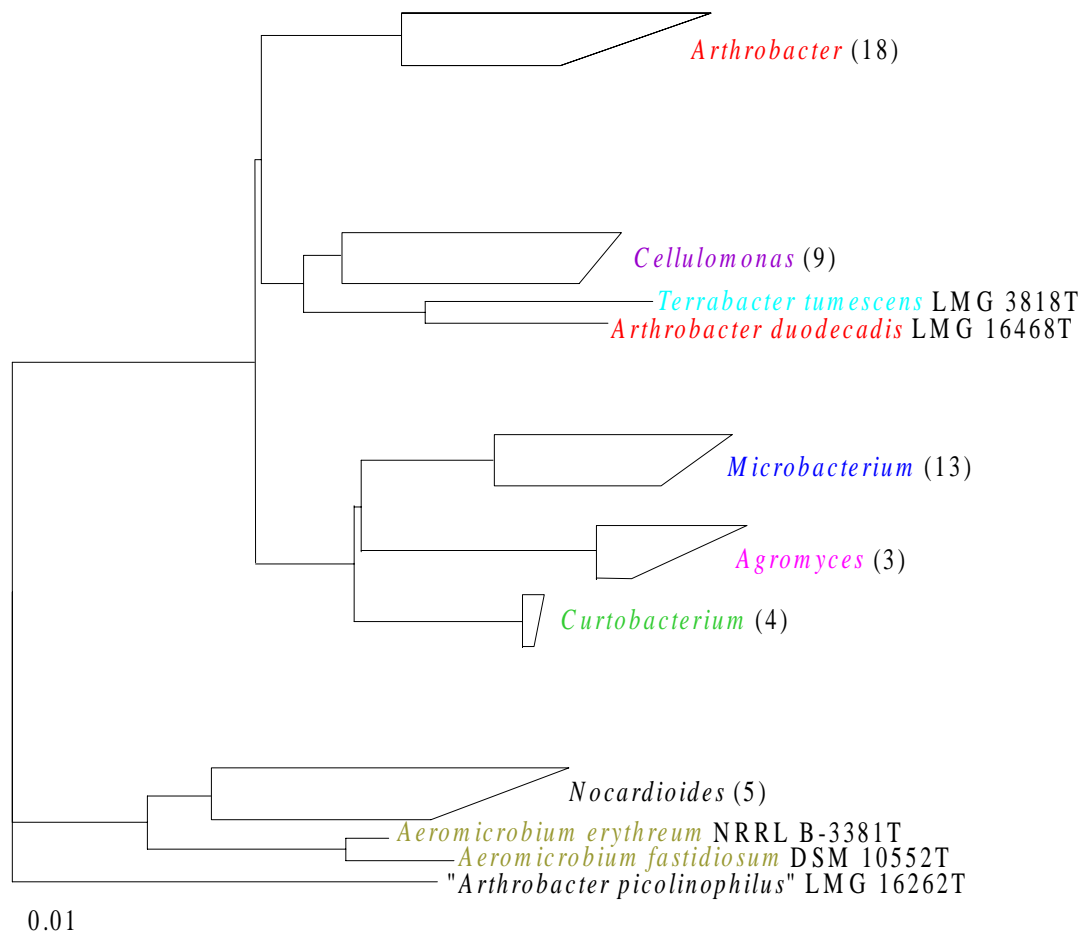
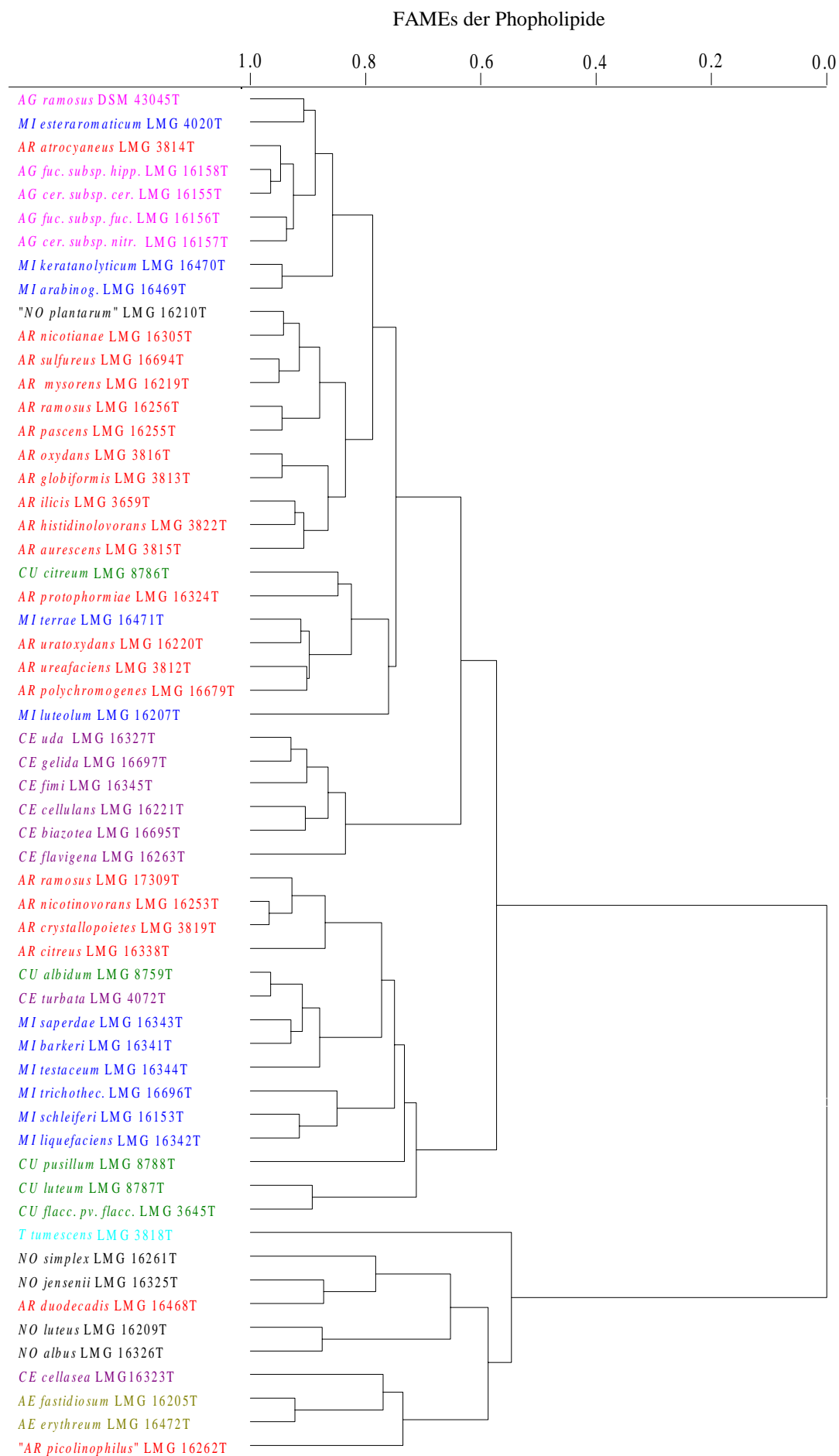
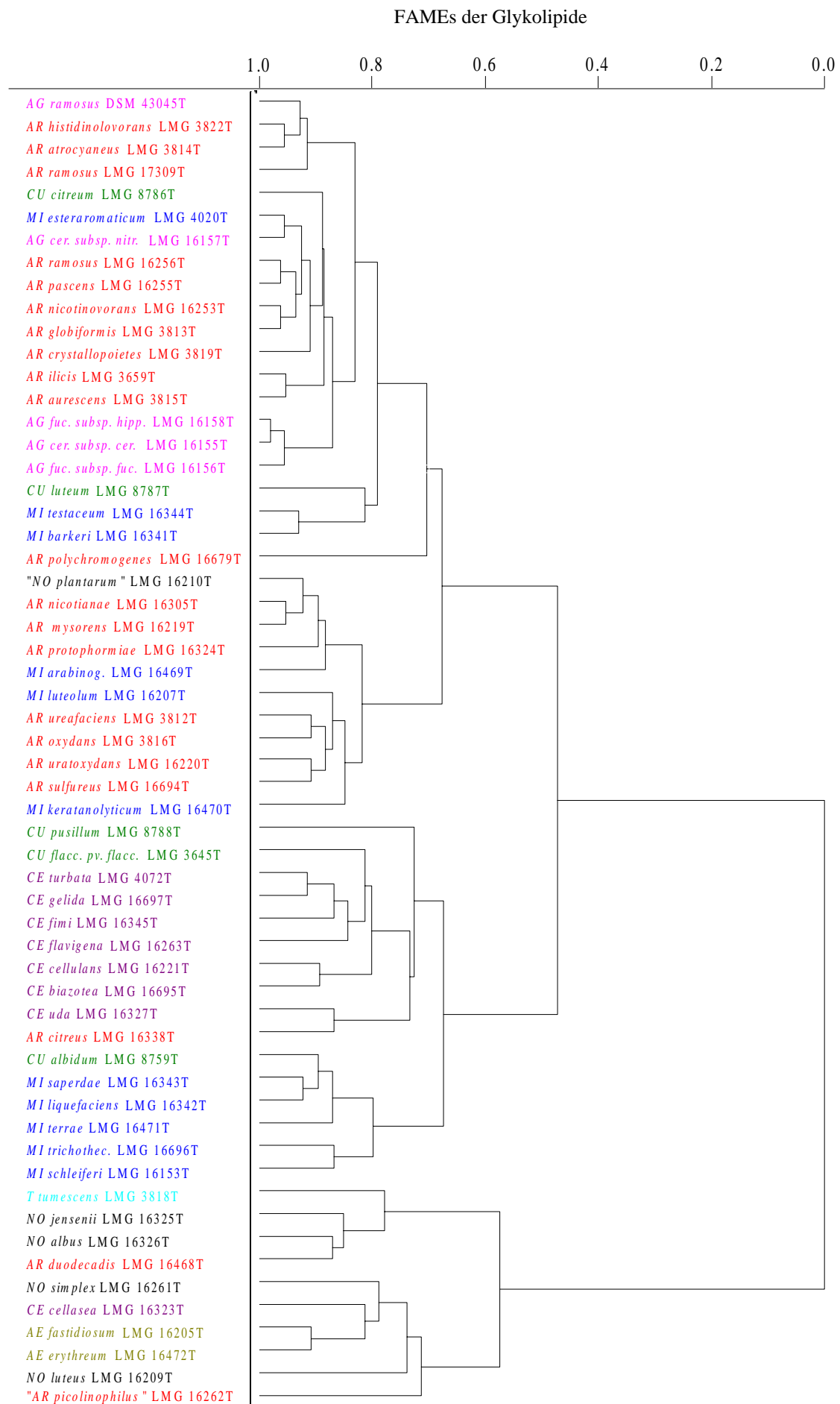


Abb. 3.12: Vereinfachtes Dendrogramm, welches die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den analysierten Gattungen der coryneformen Bakterien zeigt. In Klammern ist die Anzahl der berücksichtigten Sequenzen pro Gattung angegeben.

Der in Abb. 3.12 dargestellte vereinfachte Stammbaum verdeutlicht, daß die analysierten Gattungen monophyletische Gruppen bilden. Die engste Verwandtschaft weisen die drei Gattungen *Microbacterium*, *Agromyces* und *Curtobacterium* auf, die durch das gemeinsame chemotaxonomische Merkmal der Peptidoglycanvariante vom Typ B charakterisiert sind. In früheren Untersuchungen (Larsen et al., 1993; Embley und Stackebrandt, 1994) hatten Wissenschaftler die Spezies *Terrabacter tumescens* dem Abstammungszweig der Gattung *Arthrobacter* zugeordnet. Die durchgeführten Sequenzvergleiche beschränkten sich jedoch auf 200 Nukleotide pro Sequenz. Der Ausbau der Datenbank und die Berechnung der Sequenzähnlichkeiten unter Berücksichtigung der nahezu vollständigen Länge des 16S rRNA-Gens veränderten das Bild deutlich und zeigten eine gemeinsame Abstammungslinie mit der Gattung *Cellulomonas* (Rainey et al., 1995). Eine weitere Gruppe bilden die beiden Gattungen *Nocardioides* und *Aeromicrobium*. Diese beiden Gattungen sind durch das Auftreten von Diaminopimelinsäure als Zellwanddiaminosäure charakterisiert.





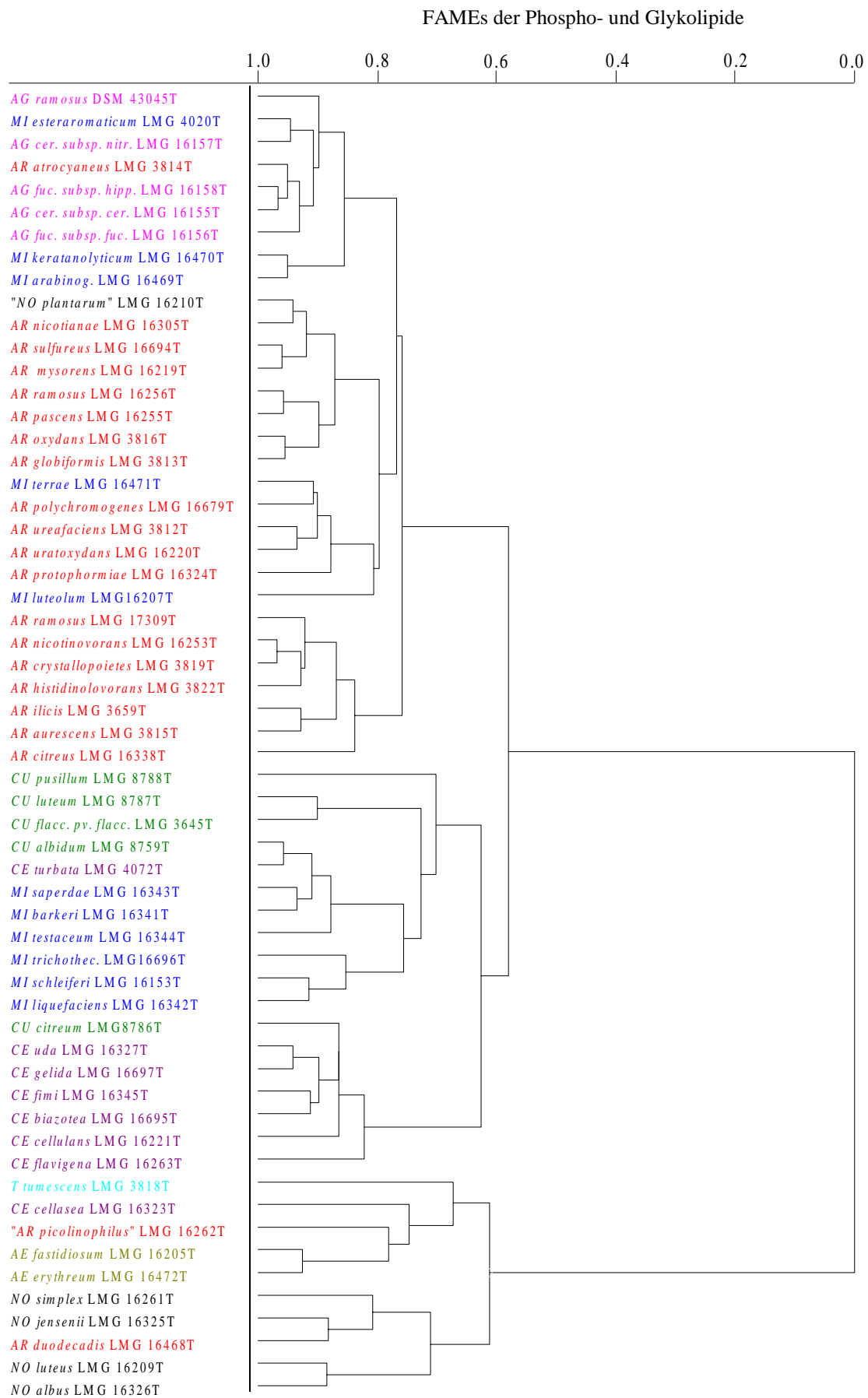


Abb. 3.13: Auf einer numerischen Analyse der Phospholipidfettsäuren der analysierten Typstämme basierendes Dendrogramm (s. S. 92).

Abb. 3.14: Ähnlichkeitsdendrogramm, basierend auf einer numerischen Analyse der Glykolipidfettsäuren der verschiedenen coryneformen Referenztypstämme (s. S. 93).

Abb. 3.15: Ähnlichkeitsdendrogramm, resultierend aus einer Kombination der zunächst getrennt analysierten Fettsäuren aus Phospho- und Glykolipiden (s. S. 94).

Ein Vergleich der Abb. 3.13-3.15 verdeutlicht, daß aufgrund der FAME-Profile der untersuchten Phospho- und Glykolipide keine vollständige Trennung der einzelnen Gattungen erzielt werden konnte. Eine weitergehende Analyse der drei Dendrogramme zeigte in allen Fällen eine Unterteilung der verschiedenen coryneformen Gattungen in zwei große Gruppen. Gruppe I wurde von den Gattungen *Arthrobacter*, *Agromyces*, *Cellulomonas* und *Curtobacterium* gebildet, während Gruppe II aus Vertretern der Gattungen *Aeromicrobium*, *Nocardioides* und *Terrabacter* bestand. Diese Aufteilung entspricht weitgehend den zuvor vorgestellten phylogenetischen Verhältnissen. Eine Ausnahme bildete diesbezüglich die Gattung *Terrabacter*, die auf phylogentischer Ebene durch eine gemeinsame Abstammungslinie mit der Gattung *Cellulomonas* gekennzeichnet ist. Unterschiede zwischen den Ähnlichkeitsdendrogrammen wurden bei den intergattungsspezifischen Verhältnissen innerhalb der Gruppe I beobachtet. Während das auf den FAMEs der Phospholipide basierende Dendrogramm parallel zum phylogenetischen Stammbaum eine recht enge Verwandtschaft zwischen den Gattungen *Arthrobacter* und *Cellulomonas* zeigte, führte die Berücksichtigung der FAME-Profile der Glykolipidfraktionen zu einer Clusterung der *Cellulomonas*-Arten mit den Gattungen *Microbacterium* und *Curtobacterium*. Auffällig war weiterhin die abweichende Gruppierung der Gattung *Arthrobacter*. Im Gegensatz zu Abb. 3.15, bei der die Arten *Ar. ramosus*, *Ar. nicotinovorans*, *Ar. crystallopoietes* und *Ar. citreus* einen der Gattungen *Microbacterium* und *Curtobacterium* angegliederten Zweig bildeten, wurde bei den anderen beiden Dendrogrammen keine Separation dieser Spezies von den anderen *Arthrobacter*-Arten festgestellt.

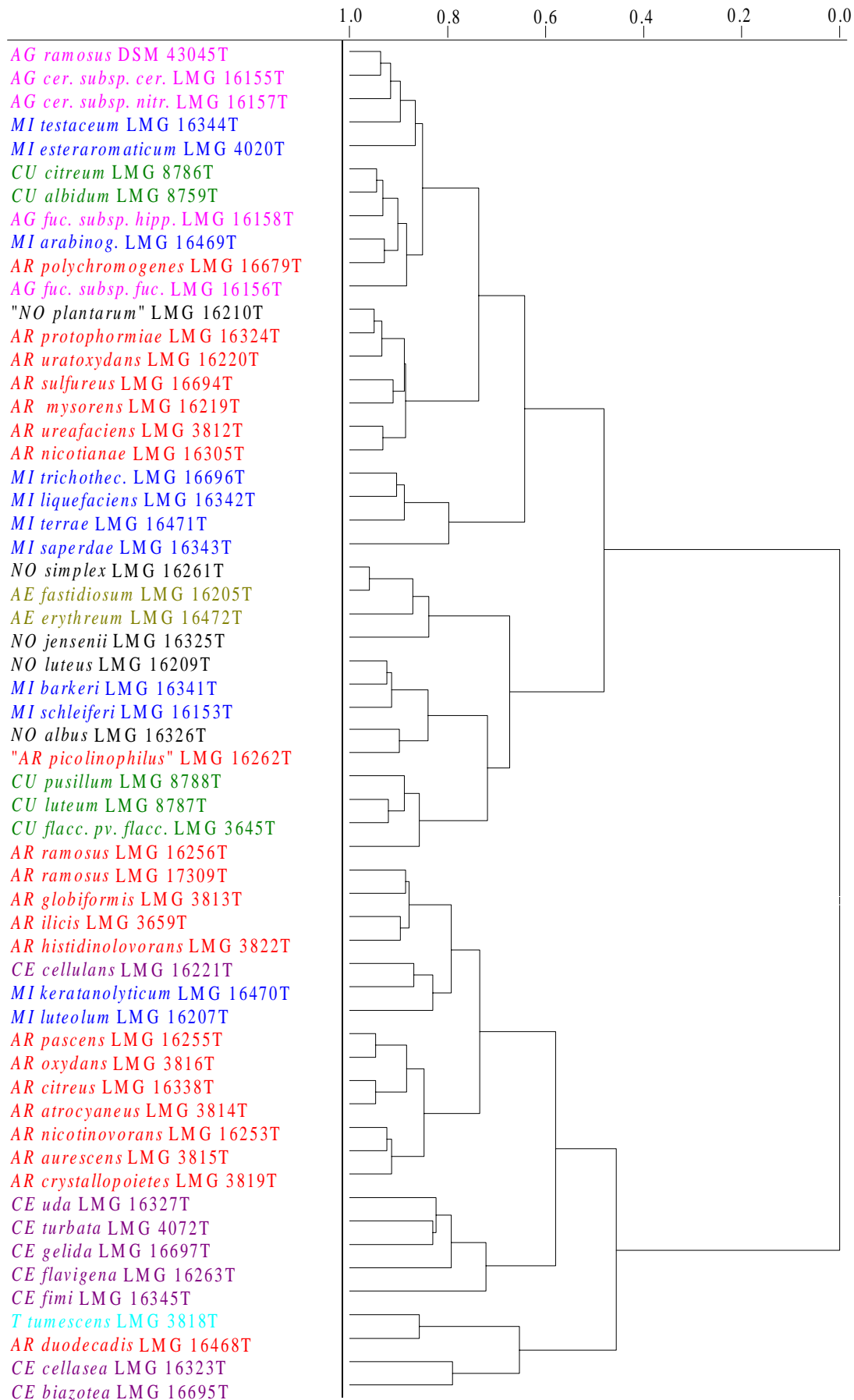


Abb. 3.16: Dendrogramm, basierend auf einem Vergleich der massenspektroskopisch analysierten intakten Phospholipide. In die Berechnung wurden nur die Typstämme der Referenzorganismen einbezogen.

Das in Abb. 3.16 dargestellte Ähnlichkeitsdendrogramm, welches auf den Profilen der intakten polaren Lipide basiert, zeigte nur ansatzweise eine Trennung der verschiedenen coryneformen Gattungen. Die beobachtete Aufteilung der untersuchten Organismen entsprach nicht den phylogenetischen Verhältnissen. Abgetrennte Sektionen bildeten lediglich die Gattungen *Cellulomonas* und *Aeromicrobium* sowie ansatzweise die *Agromyces*-Arten. Die Typstämme der anderen Gattungen bildeten vereinzelte Gruppierungen, die sich überlagerten und sich über einen weiten Bereich des Dendrogramms erstreckten.

3.12 Identifizierung von Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten

Isolate, die von Kooperationspartnern innerhalb des HRAMI-Projektes aufgrund vorangegangener Untersuchungen den coryneformen Bakterien zugeordnet worden waren, sollten im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden. Dazu wurde für jedes Isolat sowohl die Zusammensetzung der intakten polaren Lipide als auch das Fettsäuremuster ermittelt und anschließend mit den in den entsprechenden Datenbanken vorhandenen Referenzprofilen numerisch verglichen. Zusätzlich wurde von jedem Stamm, mit Ausnahme der Isolate von Antoon D. L. Akkermans (Wageningen Agriculture University), die Sequenz der 16S rDNA nahezu vollständig bestimmt (*E. coli* Numerierung: 27-1492). Die durch Vergleich mit Referenzdaten (16S rRNA und rDNA) unter Verwendung des FASTA-Servers der EMBL (Stoesser et al., 1998) ermittelten Ähnlichkeiten sind den Tabellen 3.34-3.36 zu entnehmen. Die Sequenzen der am nächsten verwandten Stämme wurden für das *Alignment* von der EMBL-Datenbank heruntergeladen und in den Olsen-Editor eingelesen. Dort wurden die Sequenzen manuell ausgerichtet. In den genannten Tabellen sind weiterhin die Ähnlichkeitswerte der sequenzierten Umweltisolate zu dem Typstamm der Typart der jeweiligen Gattung aufgeführt. Die Berechnung dieser Werte erfolgte unter Verwendung des Olsen-Editors. Es wurden mit Ausnahme unsicherer Positionen alle Sequenzabschnitte berücksichtigt, d.h. auch die hypervariablen Regionen. Traten Abweichungen zu der von Ingrid Groth (Hans-Knöll-Institut e.V – HKI, Jena) aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale erfolgten Identifizierung auf, wurde zudem die Ähnlichkeit zum Typstamm der Typart der betreffenden Gattung angegeben.

Insgesamt wurden 71 Isolate aus verschiedenen Habitaten untersucht. Von den 57 sequenzierten Stämmen konnten 51 Stämme Gattungen innerhalb der Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA zugeordnet werden. Die Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen schwankten zwischen 96% und Werten nahe 100%. Insbesondere die von Vigdis Torsvik (University of Bergen) und Christa Hoch (GBF, Braunschweig) überlassenen Isolate wiesen hohe Sequenzähnlichkeiten zu den in der Datenbank gespeicherten Organismen auf. Die Isolate wurden von vier Sequenztypen dominiert, namentlich von Organismen, die dem phylogenetischen Umfeld der Gattungen *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Rhodococcus* und *Arthrobacter* angehörten.

Insgesamt konnten 33 Stämme denjenigen coryneformen Gattungen zugeordnet werden, die bei dem zuvor durchgeführten Aufbau der Datenbank als Referenzorganismen gedient hatten.

Tab. 3.35: Identifizierung der Isolate von Dr. Ingrid Groth (Hans-Knöll-Institut e.V. – HKI, Jena) durch 16S rDNA-Sequenzierung.

| LMG-Nr. | Identifizierung von Dr. I. Groth | Identifizierung durch 16S rDNA Sequenzierung | Ähnlichkeit [%] | | |
|---------|-------------------------------------|---|------------------------------|--|---|
| | | | zu diesem Stamm lt. FASTA | zum Typstamm der Typart der identifizierten Gattung ^a | zum Typstamm der Typart der von Dr. I. Groth identifizierten Gattung ^a |
| 17246 | <i>Aeromicrobium</i> | <i>Aeromicrobium fastidiosum</i> | 96.6% | 96.2% zu <i>Ae. erythreum</i> | |
| 17247 | <i>Agromyces</i> | <i>Microbacterium testaceum</i> | 97.4% | 96.5% zu <i>Mi. lacticum</i> | 93.5% zu <i>Ag. ramosus</i> |
| 17248 | <i>Agromyces</i> | <i>Microbacterium lacticum</i> | 98.8% | 96.8% zu <i>Mi. lacticum</i> | 92.2% zu <i>Ag. ramosus</i> |
| 17249 | <i>Agromyces</i> | <i>Clavibacter xyli subsp. cynodontis</i> | 95.6% | 93.8% zu <i>Cl. michigan. subsp. michigan.</i> | 93.4% zu <i>Ag. ramosus</i> |
| 17250 | <i>Agromyces</i> | <i>Clavibacter xyli subsp. cynodontis</i> | 97.5% | 95.0% zu <i>Cl. michigan. subsp. michigan.</i> | 94.3% zu <i>Ag. ramosus</i> |
| 17251 | <i>Agromyces</i> | <i>Agrococcus jenensis</i> | 95.9% | 96.1% zu <i>Agroc. jenensis</i> | 94.0% zu <i>Ag. ramosus</i> |
| 17252 | <i>Agromyces</i> | <i>Agromyces cerinus</i> | 99.9% | 98.8% zu <i>Ag. ramosus</i> | |
| 17253 | <i>Agromyces</i> | <i>Clavibacter xyli subsp. cynodontis</i> | 98.4% | 93.9% zu <i>Cl. michigan. subsp. michigan.</i> | 95.0% zu <i>Ag. ramosus</i> |
| 17255 | <i>Arthrobacter</i> | <i>Arthrobacter oxydans</i> | 99.5% | 97.4% zu <i>Ar. globiformis</i> | |
| 17256 | <i>Arthrobacter</i> | <i>Arthrobacter ramosus</i> | 96.5% | 96.2% zu <i>Ar. globiformis</i> | |
| 17257 | <i>Arthrobacter</i> | <i>Arthrobacter atrocyaneus</i> | 95.9% | 90.7% zu <i>Ar. globiformis</i> | |
| 17258 | <i>Aureobacterium</i> | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 96.9% | | |
| 17260 | <i>Aureobacterium</i> | <i>Microbacterium testaceum</i> | 97.9% | 91.2% zu <i>Mi. lacticum</i> | |
| 17261 | <i>Brachybacterium</i> | <i>Corynebacterium glucoronolyticum</i> | 97.1% | 91.2% zu <i>Co. diphtheriae</i> | 85.0% zu <i>Brachybacterium faecium</i> |
| 17263 | <i>Cellulomonas</i> | <i>Cellulomonas cellulans</i> | 96.1% | 94.7% zu <i>Ce. flavigena</i> | |
| 17264 | <i>Cellulomonas</i> | <i>Actinomyces humiferus</i> | 98.7% ^b | <i>Ac. bovis</i> | |
| 17267 | <i>Curtobacterium</i> | <i>Curtobacterium luteum</i> | 99.1% | 99.2% zu <i>Cu. citreum</i> | |
| 17268 | <i>Gordona</i> | <i>Mycobacterium fortitum</i> | 99.7% | 95.2% zu <i>Myb. tuberculosis</i> | 90.2% zu <i>Gordonia brochialis</i> |
| 17269 | <i>Gordona</i> | <i>Mycobacterium fortitum</i> | 99.2% | 95.5% zu <i>Myb. tuberculosis</i> | 93.8% zu <i>Gordonia brochialis</i> |
| 17270 | <i>Microbacterium</i> | <i>Microbacterium testaceum</i> | 97.3% | 96.6% zu <i>Mi. lacticum</i> | |
| 17271 | <i>Microbacterium</i> | <i>Microbacterium lacticum</i> | 98.2% | 98.4% zu <i>Mi. lacticum</i> | |
| 17272 | <i>Nocardioides</i> | <i>Aeromicrobium fastidiosum</i> | 96.3% | 96.0% zu <i>Ae. erythreum</i> | 85.9% zu <i>No. albus</i> |
| 17273 | <i>Nocardioides</i> | <i>Intrasporangium calvum</i> | 96.4% | 97.6% zu <i>In. calvum</i> | 90.3% zu <i>No. albus</i> |

Tab. 3.35: (Fortsetzung)

| LMG-Nr. | Identifizierung von I. Groth | Identifizierung durch 16S rDNA Sequenzierung | Ähnlichkeit [%] | | |
|---------|---|---|------------------------------|--|---|
| | | | zu diesem Stamm lt. FASTA | zum Typstamm der Typart der identifizierten Gattung ^a | zum Typstamm der Typart der von Dr. I. Groth identifizierten Gattung ^a |
| 17274 | <i>Nocardioides</i> | <i>Nocardioides albus</i> | 98.8% | 97.0% zu <i>No. albus</i> | |
| 17275 | <i>Oerskovia</i> | <i>Cellulomonas turbata</i> | 99.2% | 95.2% zu <i>Ce. flavigena</i> | |
| 17276 | <i>Oerskovia</i> | <i>Cellulomonas cellulans</i> | 97.4% | 94.2% zu <i>Ce. flavigena</i> | |
| 17277 | <i>Oerskovia</i> / <i>Promicomonospora</i> | <i>Cellulomonas cellulans</i> | 96.8% | 93.3% zu <i>Ce. flavigena</i> | 94.7% zu <i>Pro. citrea</i> |
| 17278 | <i>Oerskovia</i> / <i>Promicomonospora</i> | <i>Promicromonospora</i> <i>enterophila</i> | 99.9% | 93.0% zu <i>Pro. citrea</i> | 93.1% zu <i>Ce. flavigena</i> |
| 17279 | <i>Oerskovia</i> / <i>Promicomonospora</i> | <i>Cellulomonas cellulans</i> | 98.9% | 93.4% zu <i>Ce. flavigena</i> | 93.0% zu <i>Pro. citrea</i> |
| 17280 | <i>Promicromonospora</i> | <i>Cellulomonas cellulans</i> | 96.3% | 93.8% zu <i>Ce. flavigena</i> | 94.9% zu <i>Pro. citrea</i> |
| 17281 | <i>Promicromonospora</i> | <i>Cellulomonas cellulans</i> | 97.5% | 94.3% zu <i>Ce. flavigena</i> | 94.0% zu <i>Pro. citrea</i> |
| 17282 | <i>Pseudonocardia</i> | <i>Nocardia otidiscaviarum</i> | 99.5% | 97.4% zu <i>Noc. asteroides</i> | 89.6% zu <i>Pseudon. sulfidoxydans</i> |
| 17283 | <i>Terrabacter</i> | <i>Cellulomonas cellulans</i> | 98.9% | 93.2% zu <i>Ce. flavigena</i> | 89.9% zu <i>Ter. tumescens</i> |

^a Die Berechnung der Ähnlichkeiten erfolgte im Olsen- Editor unter Berücksichtigung aller Sequenzabschnitte, d. h. auch der hypervariablen Regionen.

^b Von diesem Isolat konnte nur eine Teilsequenz bestimmt werden.

Tab. 3.36: Identifizierung der Isolate von V. Torsvik (Department of Microbiology and Plant Physiology, University of Bergen) durch 16S rDNA-Sequenzierung.

| LMG –Nr. | Identifizierung durch 16S rDNA Sequenzierung | Ähnlichkeit zu diesem Stamm | Typart dieser Gattung | Ähnlichkeit zu dem Typstamm der Typart |
|----------|--|-----------------------------|------------------------|--|
| 17414 | <i>Bacillus macroides</i> | 99.0% ^a | <i>Bac. subtilis</i> | |
| 17415 | <i>Rhodococcus erythreus</i> | 99.7% | <i>Rh. rhodochrous</i> | 95.1% |
| 17416 | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 99.1% | <i>Mi. lacticum</i> | 97.5% |
| 17418 | <i>Rhodococcus erythreus</i> | 99.8% | <i>Rh. rhodochrous</i> | 95.2% |
| 17419 | <i>Rhodococcus erythreus</i> | 99.4% | <i>Rh. rhodochrous</i> | 94.9% |
| 17420 | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 99.1% | <i>Mi. lacticum</i> | 97.5% |
| 17421 | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 99.1% | <i>Mi. lacticum</i> | 97.6% |
| 17423 | <i>Rhodococcus erythreus</i> | 99.9% | <i>Rh. rhodochrous</i> | 95.2% |
| 17424 | <i>Rhodococcus erythreus</i> | 98.4% | <i>Rh. rhodochrous</i> | 95.2% |
| 17426 | <i>Arthrobacter globiformis</i> | 98.6% | <i>Ar. globiformis</i> | 98.6% |
| 17427 | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 99.2% | <i>Mi. lacticum</i> | 97.6% |

^a Von diesem Isolat konnte nur eine Teilsequenz bestimmt werden.

Tab. 3.37: Identifizierung der Isolate von Christa Hoch (GBF, Arbeitsgruppe Mikrobielle Ökologie, Braunschweig) durch 16S rDNA-Sequenzierung.

| Stamm-Bezeichnung | Identifizierung durch 16S rDNA Sequenzierung | Ähnlichkeit zu diesem Stamm | Typart dieser Gattung | Ähnlichkeit zu dem Typstamm der Typart |
|-------------------|--|-----------------------------|------------------------|--|
| 24D-01 | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 99.8% | <i>Mi. lacticum</i> | 97.7% |
| Bip-010b | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 99.2% | <i>Mi. lacticum</i> | 97.5% |
| Nap-23 | <i>Microbacterium testaceum</i> | 97.8% | <i>Mi. lacticum</i> | 96.7% |
| Nap-26a | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 99.6% | <i>Rh. rhodochrous</i> | 95.2% |
| Nap-57 | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 99.5% | <i>Mi. lacticum</i> | 97.9% |
| oXy-07e | <i>Agromyces mediolanus</i> | 99.1% | <i>Ag. ramosus</i> | 96.4% |
| oXy-22 | <i>Microbacterium liquefaciens</i> | 99.1% | <i>Mi. lacticum</i> | 97.6% |

3.12.1 Isolate innerhalb der Familie *Microbacteriaceae*

Insgesamt konnten 22 Isolate aufgrund der durchgeführten phylogenetischen Analyse in die Familie *Microbacteriaceae* eingeordnet werden. Die größte Anzahl gruppierte dabei innerhalb der Gattung *Microbacterium* (15 Stämme), die anderen Isolate teilten sich auf die Gattungen *Agromyces* (2 Stämme), *Clavibacter* (3 Stämme), *Agrococcus* (1 Stamm) und *Curtobacterium* (1 Stamm) auf. Sie sollen in den beiden nachfolgenden Kapiteln näher vorgestellt werden.

3.12.1.1 Isolate innerhalb der Gattung *Microbacterium*

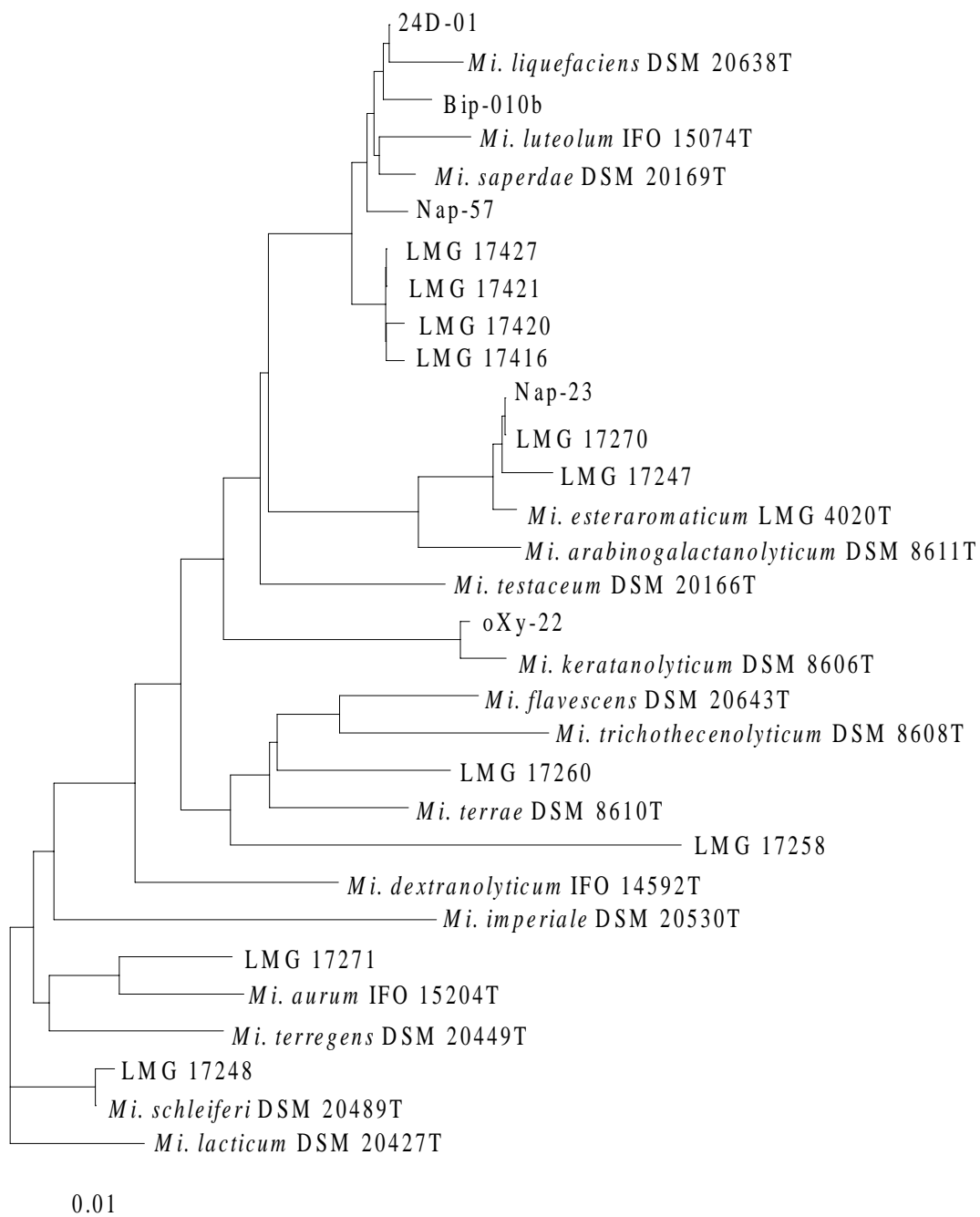


Abb. 3.17: Phylogenetisches Dendrogramm, welches die 16S rRNA-Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den analysierten Umweltisolaten zeigt, die der Gattung *Microbacterium* angegliedert sind. Evolutionäre Distanzen wurden mit dem Jukes und Cantor (1969) Algorithmus berechnet, der hieraus resultierende Stammbaum wurde mit dem Algorithmus von Fitch bestimmt. Auch die hypervariablen Regionen wurden bei der Berechnung berücksichtigt, nur die unklaren Positionen wurden ausgeschlossen.

Wie Abb. 3.17 zu entnehmen ist, sind die Sequenzen der Stämme LMG 17416, 17420, 17421 und 17427 nahezu identisch und ordnen sich mit den ebenfalls nahe verwandten Stämmen 14D-01 und Bip-010b in eine Gruppe mit *Mi. liquefaciens* DSM 20638T, *Mi. luteolum* IFO 15074 und *Mi. saperdae* DSM 20169T ein. Eine zweite Gruppe von Isolaten (Nap-23, LMG 17247 und LMG 17270) weist untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit auf und ist eng mit *Mi. esteraromaticum* LMG 4020T assoziiert. Hierbei bemerkenswert ist die Tatsache, daß aus zwei grundsätzlich verschiedenen Habitaten Organismen mit identischen 16S rDNA-Sequenzen isoliert wurden.

Eigene, von den anderen *Microbacterium*-Stämmen deutlich abgetrennte Zweige, bildeten hingegen die Stämme LMG 17260 und LMG 17258.

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Die Fettsäurezusammensetzung der Phospho- und Glykolipidfraktionen bestätigten die phylogenetische Gruppierung der Isolate (Tab. 3.38-3.39). Die analysierten Stämme zeigten untereinander auch aufgrund dieses phänotypischen Merkmals enge Verwandtschaftsgrade. Sie gruppieren zusammen in das gemischte *Microbacterium/Agromyces*-Cluster der Referenzorganismen. Abweichend verhielten sich die Stämme LMG 17248 und 17258. LMG 17248 clusterte innerhalb der zweiten Gruppe von *Microbacterium*-Referenzstämmen und wies hierbei wie schon bei den 16S rDNA-Sequenzen die größte Ähnlichkeit zu *Mi. schleiferi* DSM 20489T auf. Für den Stamm LMG 17258 wurde hingegen ein von den Microbakterien stark abweichendes Fettsäuremuster detektiert, weshalb dieser Stamm innerhalb der Arthrobakterien gruppiert wurde. Die beiden Stämme LMG 17259 und 17422 wurden ausschließlich aufgrund des übereinstimmenden Fettsäureprofils in die hier beschriebene Gruppe eingeordnet. Eine phylogenetische Bestätigung dieses Ergebnisses konnte nicht erfolgen, da kein Amplifikationsprodukt der 16S rDNA erhalten wurde.

Tab. 3.38: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenz der phylogenetischen Umgebung der Gattung *Microbacterium* zugeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1ω8i | 18:2ω6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|----------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|---------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| 17247 | tr ^c | - | 2.4 | 24.8 | - | 12.9 | - | 3.0 | 3.2 | 53.2 | - | - | - | - | - | - | - | tr | - |
| 17248 | - ^d | - | tr | 13.1 | - | 6.6 | - | tr | tr | 56.8 | tr | - | - | - | - | 6.4 | - | 9.9 | tr |
| 17258 | 2.0 | tr | 30.0 | 52.9 | - | 7.3 | tr | 1.9 | 1.3 | 2.5 | - | - | - | tr | - | - | - | tr | - |
| 17259 | - | - | 2.0 | 26.0 | - | 4.9 | - | 2.9 | 4.5 | 56.6 | tr | - | - | - | - | 1.9 | - | tr | - |
| 17260 | tr | - | 5.1 | 29.7 | - | 5.0 | - | tr | 24.2 | 28.2 | tr | - | - | - | - | tr | tr | 1.6 | tr |
| 17270 | tr | - | 5.6 | 28.3 | tr | 11.9 | - | 2.7 | 7.8 | 42.9 | - | - | - | - | - | - | - | tr | - |
| 17271 | tr | - | 1.2 | 36.67 | - | 6.3 | tr | 2.3 | 4.3 | 35.8 | tr | - | - | tr | - | 3.2 | - | 2.4 | tr |
| 17416 | tr | tr | 4.9 | 24.1 | tr | 11.9 | - | 2.9 | 6.9 | 47.0 | tr | - | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| 17420 | tr | - | 5.9 | 27.3 | tr | 13.6 | - | 2.1 | 6.4 | 42.9 | tr | - | - | - | - | tr | - | tr | tr |
| 17421 | tr | - | 6.7 | 26.7 | tr | 13.7 | - | 2.6 | 6.3 | 41.5 | tr | - | - | - | - | tr | - | tr | tr |
| 17422 | tr | - | 6.5 | 31.3 | tr | 13.0 | - | 1.7 | 4.6 | 41.7 | - | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| 17427 | - | - | 2.7 | 11.3 | tr | 9.9 | - | 2.8 | 9.3 | 61.0 | tr | - | - | - | - | tr | tr | tr | - |
| 24D-01 | tr | tr | 4.0 | 26.0 | tr | 13.8 | - | 4.6 | 7.3 | 42.0 | tr | - | - | - | - | tr | - | tr | tr |
| Bip-010b | tr | tr | 8.1 | 35.3 | tr | 10.7 | tr | 1.7 | 6.4 | 36.2 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| Nap-23 | tr | tr | 8.2 | 31.4 | tr | 10.8 | tr | 4.8 | 7.5 | 35.8 | tr | - | - | - | - | - | - | tr | - |
| Nap-57 | tr | tr | 1.7 | 38.0 | tr | 14.8 | - | 2.0 | 1.7 | 40.2 | tr | - | - | - | - | - | - | tr | tr |
| oXy-22 | tr | tr | 7.2 | 26.0 | tr | 26.9 | - | 1.8 | 8.3 | 24.4 | tr | - | - | - | - | tr | - | tr | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Stämme enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: LMG 17248 enthielt zusätzlich 19:1ω8 (9.9%) und 20:0 (3.2%) und LMG 17425 enthielt zusätzlich 12:0 (5.7%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1ω6/t18:1ω9/ t18:1ω12 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.39: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenz der phylogenetischen Umgebung der Gattung *Microbacterium* zugeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2ω6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|----------|-----------------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| 17247 | - ^d | - | tr | 1.6 | 16.4 | - | 8.7 | - | 3.1 | 5.6 | 61.4 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| 17248 | - | - | tr | tr | 9.0 | - | 4.9 | - | 1.8 | tr | 46.8 | - | tr | 1.8 | - | 1.1 | - | 8.6 | - | 12.9 | tr |
| 17258 | tr ^c | 1.4 | tr | 35.7 | 25.3 | tr | 18.0 | - | 5.4 | 5.5 | 6.6 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | - | - |
| 17260 | tr | tr | 2.5 | 4.2 | 27.2 | - | 4.0 | - | 3.0 | 20.2 | 27.4 | - | tr | 3.9 | tr | 1.7 | - | 1.5 | - | 1.8 | tr |
| 17270 | 2.5 | tr | 1.6 | 5.8 | 29.6 | tr | 7.4 | - | 3.0 | 8.5 | 38.0 | tr | tr | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | - |
| 17271 | 1.2 | tr | tr | tr | 35.4 | - | 2.4 | - | 1.4 | 2.0 | 29.9 | - | tr | 5.3 | tr | tr | - | 4.4 | - | 11.9 | tr |
| 17414 | - | tr | 1.8 | 5.6 | 16.6 | tr | 3.3 | - | 26.6 | 11.4 | 10.3 | - | tr | tr | tr | 5.4 | tr | 6.1 | - | tr | - |
| 17416 | 3.0 | tr | 1.9 | 3.6 | 17.9 | tr | 8.0 | - | 3.8 | 6.6 | 49.6 | - | tr | tr | tr | tr | tr | 1.1 | - | 1.2 | tr |
| 17420 | 1.8 | tr | tr | 4.6 | 16.8 | tr | 10.2 | - | 3.1 | 8.2 | 50.2 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| 17421 | 4.4 | tr | 2.4 | 3.8 | 15.1 | tr | 7.6 | - | 3.9 | 6.6 | 49.3 | - | tr | tr | tr | tr | tr | 1.5 | - | 1.6 | tr |
| 17422 | tr | tr | tr | 5.0 | 19.8 | tr | 10.1 | - | 2.7 | 6.6 | 50.3 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | 1.1 | tr |
| 17427 | tr | tr | tr | 4.3 | 15.7 | tr | 8.2 | - | 3.4 | 7.8 | 53.1 | tr | tr | tr | tr | tr | - | 1.3 | tr | 1.7 | tr |
| 24D-01 | 2.0 | tr | 2.0 | 3.7 | 23.7 | tr | 9.8 | - | 4.7 | 7.2 | 42.4 | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | - | 1.1 | tr |
| Bip-010b | tr ^c | tr | 2.2 | 5.8 | 25.8 | tr | 7.3 | - | 3.5 | 8.6 | 40.0 | tr | tr | tr | tr | 1.3 | - | tr | - | tr | 1.1 |
| Nap-23 | tr | tr | tr | 7.3 | 29.5 | tr | 6.9 | - | 3.7 | 10.8 | 37.6 | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| Nap-57 | tr | tr | 2.2 | 1.2 | 28.2 | tr | 10.5 | - | 4.1 | 2.1 | 44.4 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | 1.1 |
| oXy-22 | 5.0 | tr | 4.4 | 6.3 | 22.0 | tr | 20.1 | - | 4.0 | 8.2 | 23.0 | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Stämme enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: LMG 17248 enthielt zusätzlich 20:0 (10.9%); LMG 17258 enthielt zusätzlich 15:1ω6 (1.4%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

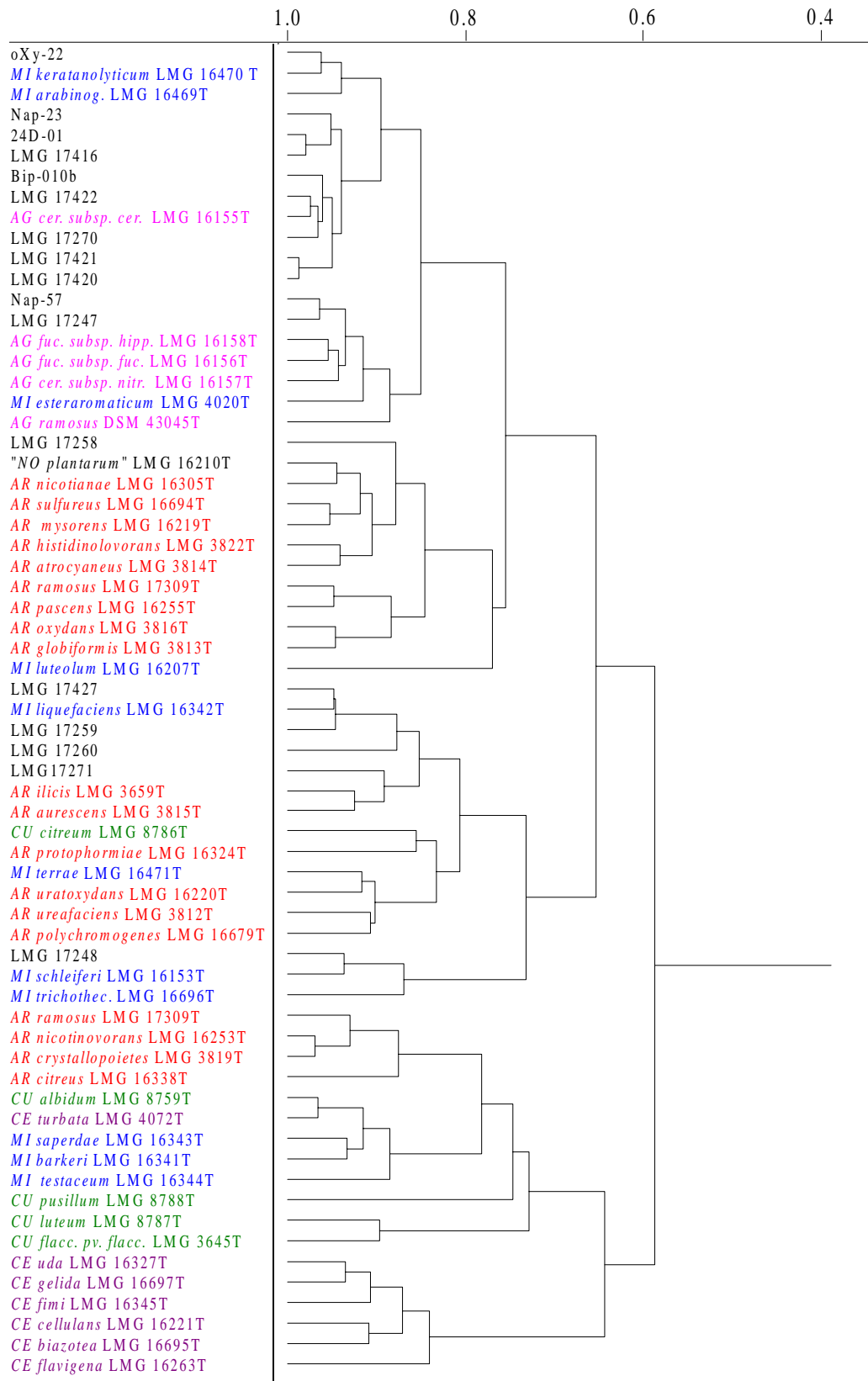


Abb. 3.18: Dendrogramm, welches die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb ausgewählter Umweltisolate, basierend auf den Fettsäuren der Phospholipide, zeigt. Die Isolate wurden zuvor aufgrund von 16S rDNA-Ähnlichkeiten in die Gattung *Microbacterium* eingeordnet. Zur besseren Orientierung wurden bei der Berechnung des Dendrogramms zusätzlich die Typstämme aller analysierten Referenzorganismen berücksichtigt. Es ist nur der für die Isolate relevante Bereich abgebildet.

3.12.1.2 Isolate innerhalb der Gattungen *Agromyces*, *Agrococcus*, *Clavibacter* und *Curtobacterium*

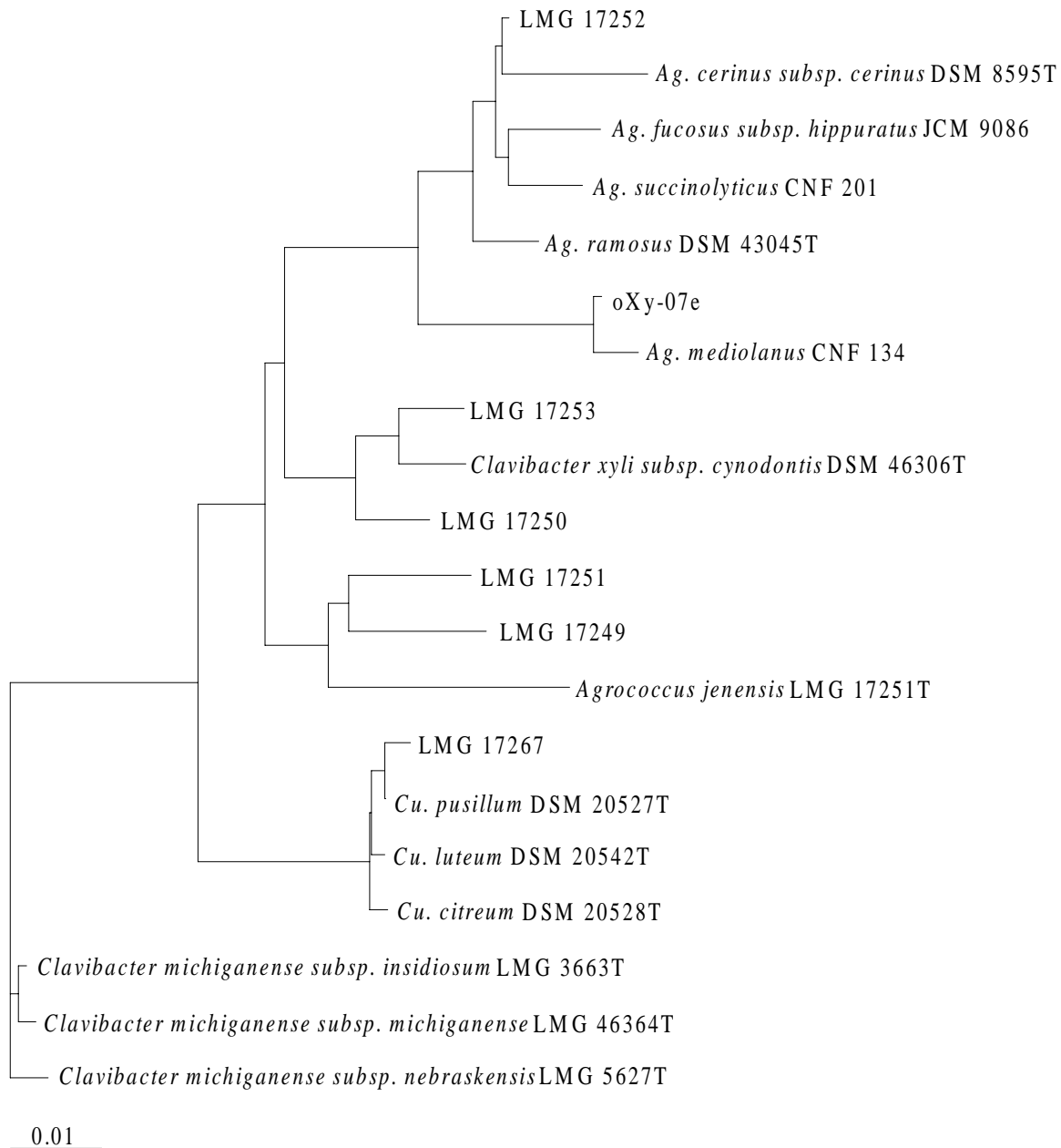


Abb. 3.19: Phylogenetischer Stammbaum zur Einordnung ausgewählter Umweltisolate, beruhend auf der Sequenzierung der nahezu vollständigen 16S rRNA-Gene. Im Baum sind nur relevante Vertreter der Gattungen *Agromyces*, *Agrococcus*, *Clavibacter* und *Curtobacterium* dargestellt. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 1%.

Sehr große Sequenzähnlichkeiten wurden bei LMG 17252 zu *Ag. cerinus subsp. cerinus* DSM 8595T (99.1%), oXy-07e zu *Ag. mediolanus* CNF 134 (99.1%) und LMG 17267 zu *Cu. luteum* (99.1%) festgestellt. Etwas niedrigere Werte ergaben sich für LMG 17250 und LMG 17253

zu *Clavibacter xyli subsp. cynodontis* DSM 43306T mit Sequenzähnlichkeiten von 98.4 bzw. 97.5%. Der Stamm *Clavibacter xyli subsp. cynodontis* DSM 43306T selbst fiel durch seine große phylogenetische Entfernung von den anderen Subspezies dieser Art auf. Eigene Zweige bildeten die Stämme LMG 17249 und 17251. Diese Stämme wären aufgrund ihrer phylogenetischen Position für eine weiterführende Charakterisierung von großem Interesse.

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Die Isolate dieser Gruppe zeigten ein qualitativ recht einheitliches Bild, welches sich vorwiegend aus den Fettsäuren 17:0a, 15:0a und 16:0i zusammensetzte (Tab. 3.40-3.41) und damit den Referenzdaten der Gattungen *Microbacterium*, *Agromyces* und *Curtobacterium* entsprach. Trotz dieser generellen Gemeinsamkeiten in den Fettsäureprofilen waren die Isolate aufgrund der großen Ähnlichkeit der FAME-Zusammensetzung der genannten Gattungen über einen weiten Bereich des Dendrogramms verteilt (Abb. 3.20). Auffällig verhielt sich der Stamm LMG 17253 durch die großen Mengen an 16:0i. Die Spezies LMG 17267 zeigten aufgrund des hohen Anteils der Fettsäure 18:2 ω 6,9 die größte Ähnlichkeit zu *Cu. pusillum* DSM 20527T. Dies wurde durch die phylogenetische Eingruppierung unterstützt und verdeutlichte die Sonderstellung von *Cu. pusillum* DSM 20527T innerhalb der Gattung *Curtobacterium* bezüglich des Fettsäureprofils. Der Stamm LMG 17251 mit dem nächsten Verwandten *Agrococcus jenensis* LMG 17251T war aufgrund des Fettsäuremusters Vertretern der Gattung *Microbacterium* zuzuordnen. Dies stimmt mit den phylogenetischen Verhältnissen überein, denn auch auf Basis der 16S rDNA-Sequenzen weist die Gattung *Agrococcus* die größte Ähnlichkeit zu Vertretern der Microbakterien auf (Groth et al., 1996). Von den Stämmen LMAU C37 und C33 lagen keine Sequenzen vor; sie wurden allein aufgrund der durch Dr. A. Akkermans erfolgten Identifizierung in diese Gruppe aufgenommen. oXy-07e gruppierte im Dendrogramm, welches auf der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide basierte, zusammen mit *Ar. ramosus* LMG 17309T. Diese Position entsprach auf der einen Seite nicht der phylogenetischen Eingruppierung, spiegelte auf der anderen Seite aber auch die Ähnlichkeiten der Fettsäureprofile nicht vollständig wider. Ein Vergleich der Rohdaten offenbarte die Gemeinsamkeiten mit Stämmen der Gattung *Agromyces*. Dies zeigte auch die Clusteranalyse, bei der nicht nur die Typstämmen, sondern auch alle anderen analysierten Referenzstämme Berücksichtigung fanden.

Tab. 3.40: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen der phylogenetischen Umgebung der Gattungen *Agromyces*, *Agrococcus*, *Clavibacter* und *Curtobacterium* zugeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1ω8i | 18:2ω6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|---------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|---------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| C33 | tr ^c | 2.5 | 2.0 | 37.7 | tr | 11.7 | tr | 9.9 | tr | 33.8 | tr | - | - | tr | - | tr | - | - | - |
| C37 | tr | tr | tr | 34.0 | tr | 16.3 | tr | 8.2 | tr | 34.8 | tr | - | - | tr | - | 2.4 | - | - | - |
| 17249 | tr | - | 1.3 | 32.0 | - | 14.7 | tr | 1.1 | tr | 40.6 | - | - | 2.3 | - | - | tr | - | 1.1 | - |
| 17250 | - ^d | - | tr | 13.7 | - | 11.6 | - | tr | tr | 72.6 | - | - | - | - | - | - | - | tr | - |
| 17251 | - | - | tr | 35.5 | - | 7.0 | - | tr | tr | 53.6 | tr | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| 17252 | - | - | 1.3 | 14.6 | - | 13.9 | - | 1.9 | 2.4 | 63.3 | tr | - | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| 17253 | tr | 4.4 | 1.3 | 16.7 | tr | 11.5 | 3.6 | 20.6 | 1.1 | 29.7 | tr | - | - | 1.1 | 4.9 | 2.6 | - | tr | - |
| 17267 | tr | tr | tr | 17.4 | tr | 8.7 | - | 8.5 | tr | 27.4 | tr | - | 32.7 | - | - | tr | - | - | - |
| oXy-07e | tr | tr | 1.9 | 20.9 | tr | 13.8 | tr | 2.9 | 1.2 | 55.1 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Stämme enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: LMG 17249 enthielt zusätzlich 19:1ω8 (1.1%) und LMG 17267 enthielt zusätzlich den unbekannten FAME (ECL 19.78) (1.9%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1ω6/t18:1ω9/ t18:1ω12 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab 3.41: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen in die phylogenetische Umgebung der Gattung *Agromyces*, *Agrococcus*, *Clavibacter* und *Curtobacterium* eingeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2ω6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|---------|----------------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| C33 | 2.6 | tr ^c | 3.7 | 2.0 | 31.4 | tr | 11.3 | - | 13.6 | tr | 29.4 | - | tr | tr | - | tr | - | 2.7 | - | tr | - |
| C37 | 2.3 | tr | 2.9 | tr | 30.8 | tr | 16.0 | - | 9.3 | 1.1 | 25.4 | - | 1.5 | 1.3 | tr | 1.2 | - | 6.3 | - | tr | - |
| 17249 | - ^d | tr | 1.1 | 2.8 | 50.3 | - | 13.0 | - | 2.7 | 1.0 | 23.4 | - | - | tr | 1.3 | 1.0 | - | tr | - | tr | - |
| 17250 | - | - | tr | tr | 9.3 | - | 7.7 | - | 1.9 | 1.3 | 76.8 | - | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| 17251 | tr | - | tr | tr | 21.3 | - | 4.9 | - | 1.5 | tr | 67.5 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| 17252 | tr | tr | tr | 1.9 | 18.5 | - | 10.4 | - | 2.9 | 4.4 | 55.1 | - | tr | tr | - | 1.0 | - | tr | tr | 1.1 | tr |
| 17253 | 1.7 | tr | 6.5 | tr | 8.6 | tr | 8.4 | 4.5 | 24.4 | 2.1 | 30.9 | - | tr | tr | tr | 1.8 | 4.4 | 3.4 | - | tr | - |
| 17267 | tr | tr | 3.8 | 1.1 | 18.0 | tr | 8.6 | - | 14.7 | tr | 19.4 | - | tr | tr | 26.8 | - | - | 2.7 | - | tr | - |
| oXy-07e | tr | tr | 1.4 | 1.2 | 12.1 | - | 9.7 | - | 4.5 | 2.4 | 61.5 | - | - | 2.0 | - | - | - | 1.9 | - | 1.9 | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Stämme enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: LMG 17267 enthielt zusätzlich den unbekannten FAME (ECL 19.78) (2.2%) und oXy-07e enthielt zusätzlich 18:0i (2.0%) und 19:1ω8 (1.9%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

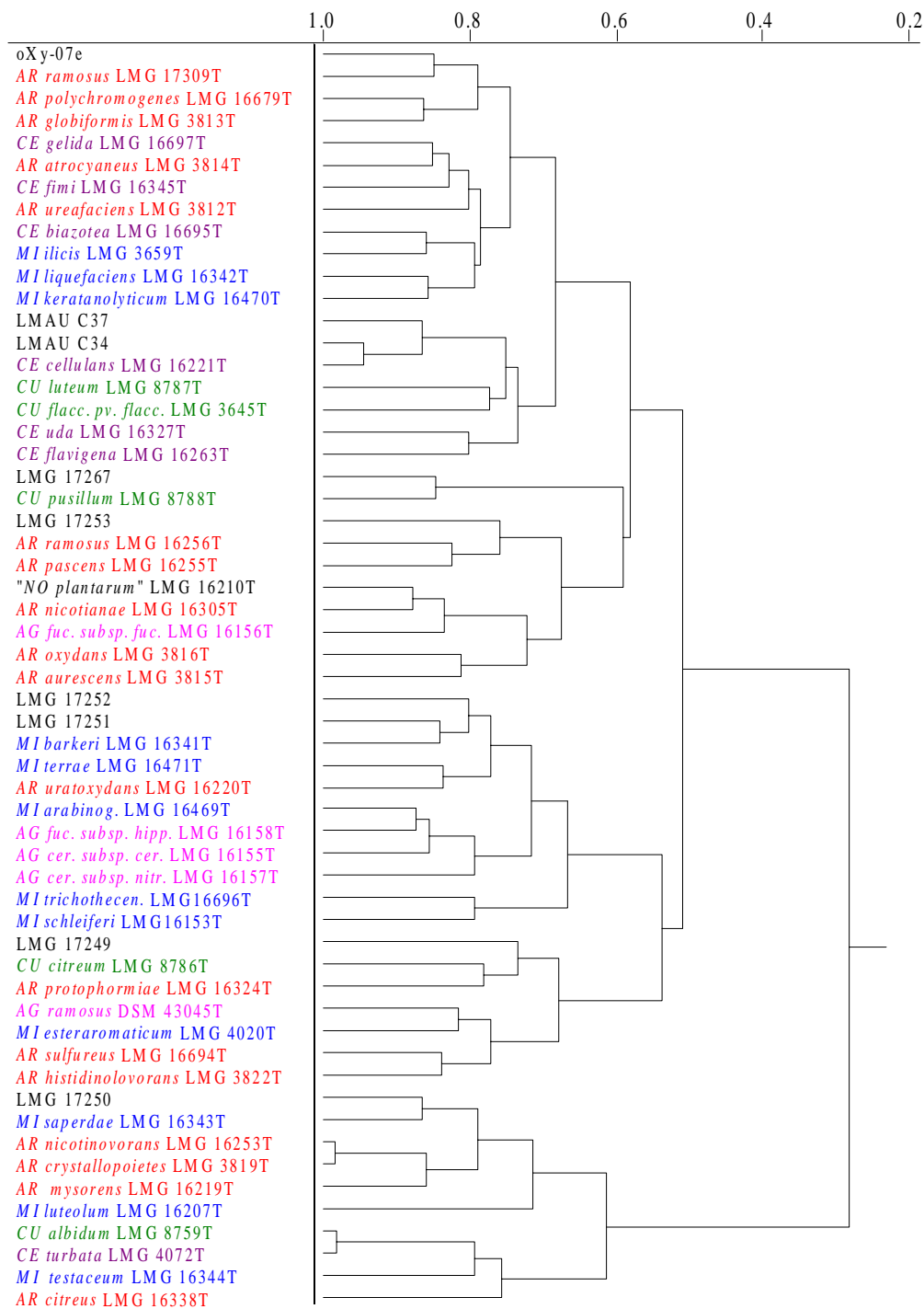


Abb. 3.20: Dendrogramm, welches die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb ausgewählter Umweltisolate basierend auf den Fettsäuren der Phospholipide, zeigt. Die Isolate wurden zuvor aufgrund von 16S rDNA-Ähnlichkeiten in das phylogenetische Umfeld der Gattungen *Agromyces*, *Agrococcus*, *Clavibacter* und *Curtobacterium* eingeordnet. Die Typstämme von *Nocardioides*, *Terrabacter* und *Aeromicrobium* sind hier nicht dargestellt, wurden bei der Berechnung des Dendrogramms jedoch berücksichtigt.

3.12.2 Umweltisolate innerhalb der Gattungen *Cellulomonas* und *Promicromonospora*

Insgesamt neun der analysierten Isolate konnten den auf phylogenetischer Ebene vermischten Gattungen *Cellulomonas* und *Promicromonospora* zugeordnet werden.

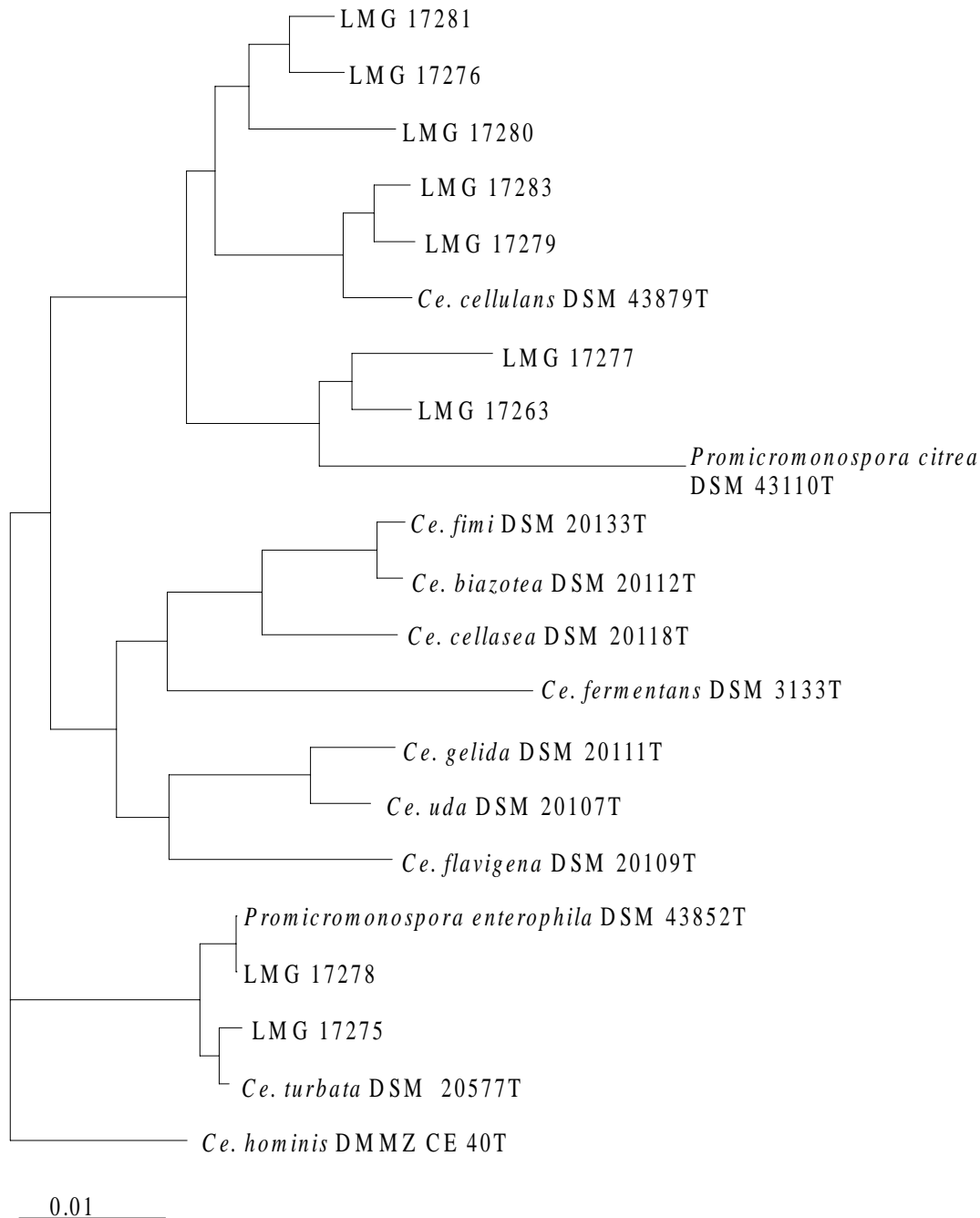


Abb. 3.21: Phylogenetisches Dendrogramm, welches die 16S rRNA-Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den analysierten Umweltisolaten zeigt, die in die Gattungen *Cellulomonas* und *Promicromonospora* eingeordnet wurden.

Der Stamm LMG 17278 wies eine nahezu 100%ige Sequenzähnlichkeit zu dem Typstamm von *Promicromonospora enterophila* auf. Weiterhin zeigten die Isolate LMG 17279 und 17283 große Sequenzähnlichkeiten zu *Ce. cellulans* DSM 43879T (98.9%), für LMG 17275 wurde eine enge Verwandtschaft zu *Ce. turbata* DSM 20577T (Sequenzähnlichkeit 99.2%) festgestellt. Die anderen Isolate wiesen geringere Verwandtschaftsgrade zu den bisher beschriebenen *Cellulomonas*-Arten auf. Insbesondere die Stämme LMG 17263 und LMG 17277 bildeten einen neuen Zweig innerhalb der genannten Gattungen.

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Die Einteilung der Isolate spiegelte sich auf Fettsäureebene wider. Die analysierten Stämme zeigten ein uniformes Fettsäuremuster, bei dem 15:0a (30-55%) die Hauptkomponente darstellte. Es wurden daneben hohe Anteile an den Fettsäuren 16:0 (12-28%) und 17:0a (13-33%) detektiert (Tab. 3.42-3.43). Diese Zusammensetzung entsprach den Profilen der *Cellulomonas*-Referenzstämmen, was auch graphisch durch das Dendrogramm belegt wird (Abb. 3.22). Alle Isolate waren in einem Cluster zusammen mit den Typstämmen der Gattung *Cellulomonas* zu finden.

Tab. 3.42: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen in die phylogenetische Umgebung der Gattungen *Cellulomonas* und *Promicromonospora* eingeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1ω8i | 18:2ω6,9 | sum2 | sum 3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|---------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|---------|----------|------|-------|------|------------|--------|------|
| 17263 | tr ^c | 5.3 | 10.8 | 46.4 | tr | 3.1 | - | 17.1 | tr | 15.0 | - | - | - | tr | - | tr | - | - | - |
| 17275 | tr | 2.7 | 2.0 | 44.3 | 1.7 | 3.7 | tr | 28.4 | tr | 14.2 | tr | - | tr | tr | - | tr | - | - | - |
| 17276 | tr | 1.7 | tr | 42.3 | tr | 5.8 | - | 14.0 | tr | 31.4 | tr | - | - | tr | - | 1.7 | - | tr | - |
| 17277 | tr | 4.0 | 5.4 | 55.1 | tr | 4.2 | tr | 16.0 | tr | 12.8 | tr | - | - | tr | - | tr | - | - | - |
| 17278 | tr | 4.7 | 3.3 | 43.7 | 1.3 | 3.2 | - | 24.0 | tr | 16.0 | tr | - | - | tr | - | 1.9 | - | tr | - |
| 17279 | tr | 3.1 | 5.0 | 40.7 | tr | 7.1 | tr | 17.7 | tr | 21.4 | tr | - | - | tr | - | 1.6 | - | tr | - |
| 17280 | tr | tr | 9.1 | 34.7 | tr | 14.4 | - | 11.6 | 1.40 | 25.4 | tr | - | - | - | - | tr | - | - | - |
| 17281 | - ^d | tr | 1.6 | 30.2 | tr | 8.3 | tr | 21.3 | tr | 33.5 | tr | - | - | tr | - | 2.2 | - | tr | - |
| 17283 | tr | 4.1 | 2.6 | 43.3 | 1.8 | 5.6 | - | 24.3 | tr | 13.4 | tr | - | - | - | - | 2.1 | - | tr | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1ω6/t18:1ω9/ t18:1ω12 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.43: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen derjenigen Umweltisolate die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen in die phylogenetische Umgebung der Gattungen *Cellulomonas* und *Promicromonospora* eingeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2ω6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|---------|-----------------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| 17263 | - ^d | - | 5.5 | 3.4 | 43.5 | tr | 1.3 | - | 22.8 | tr | 11.5 | - | - | - | tr | 6.5 | - | 3.3 | - | - | - |
| 17275 | 4.9 | tr | 8.7 | 1.1 | 34.9 | 1.4 | 1.9 | tr | 30.0 | tr | 7.3 | - | tr | - | tr | 4.6 | tr | 2.9 | - | tr | - |
| 17276 | 3.3 | tr | 9.0 | tr | 35.6 | tr | 3.0 | - | 17.9 | tr | 16.4 | - | tr | - | tr | 6.9 | tr | 3.9 | - | tr | - |
| 17277 | - | tr | 6.5 | 2.4 | 40.7 | tr | 2.3 | tr | 22.6 | tr | 9.0 | - | tr | - | 1.1 | 8.2 | tr | 3.9 | - | tr | - |
| 17278 | 1.7 | tr | 8.2 | 1.6 | 28.1 | 1.1 | 1.3 | - | 36.7 | tr | 7.9 | - | tr | - | tr | 4.3 | tr | 5.8 | - | tr | - |
| 17279 | tr ^c | tr | 6.2 | 2.2 | 32.9 | tr | 2.9 | - | 20.5 | tr | 15.8 | - | tr | tr | tr | 6.4 | tr | 6.8 | - | tr | - |
| 17280 | tr | tr | 4.2 | 13.6 | 49.0 | tr | 7.1 | - | 10.5 | tr | 7.9 | - | tr | - | tr | 2.5 | tr | 1.5 | - | - | - |
| 17281 | tr | tr | 5.3 | 1.3 | 40.0 | tr | 5.5 | - | 20.5 | tr | 15.8 | - | tr | - | tr | 4.4 | tr | 3.2 | - | tr | - |
| 17283 | - | tr | 4.1 | 1.4 | 31.1 | 1.4 | 4.1 | - | 28.5 | tr | 12.3 | - | tr | - | tr | 5.3 | tr | 4.8 | tr | tr | - |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben.

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

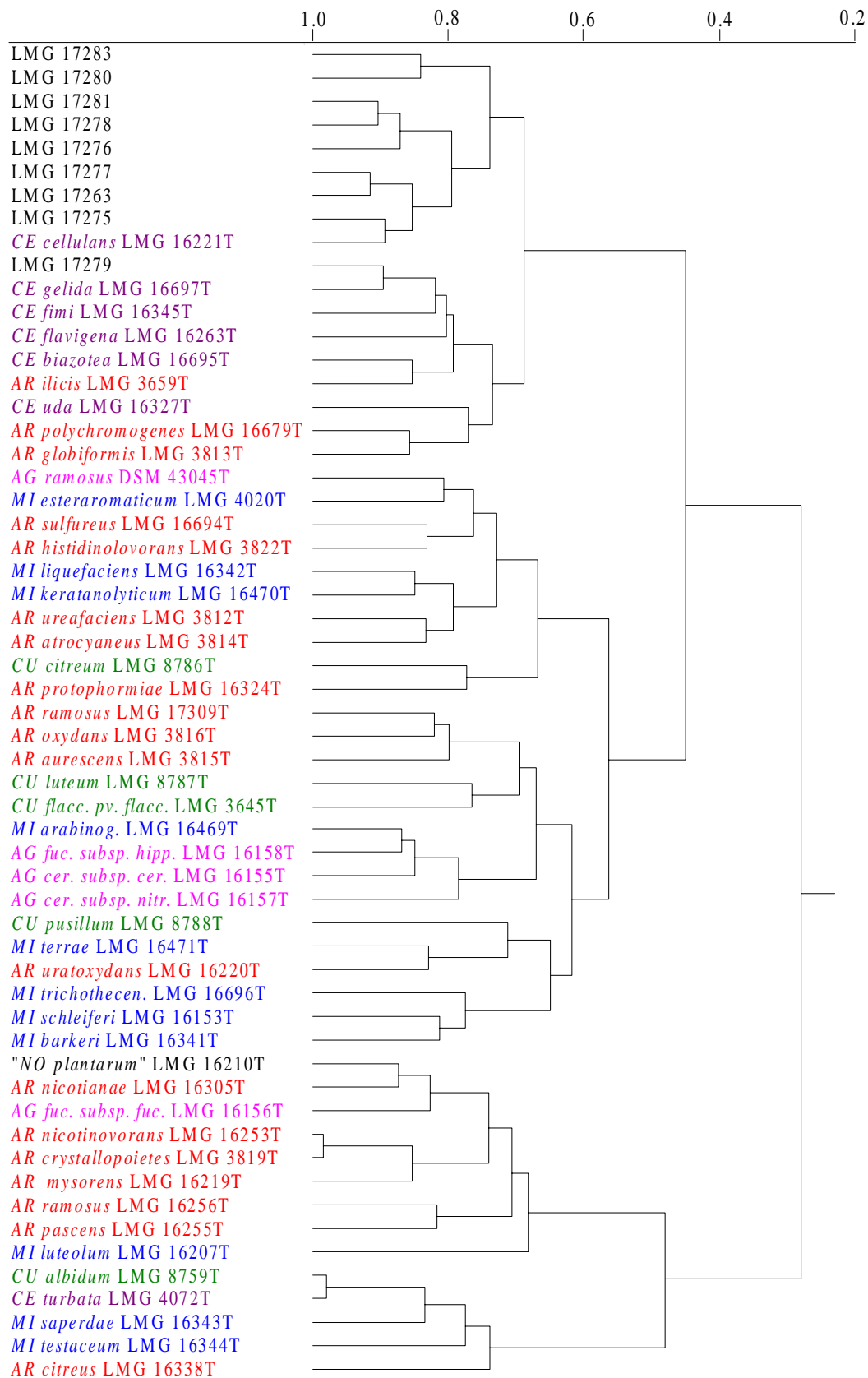


Abb. 3.22: Dendrogramm, welches die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb ausgewählter Umweltisolate, basierend auf den Fettsäuren der Phospholipide, zeigt. Die Isolate wurden zuvor anhand phylogenetischer Analysen den Gattungen *Cellulomonas* und *Promicromonospora* zugeordnet. Es ist nur der für die Isolate relevante Bereich abgebildet.

3.12.3 Isolate innerhalb der Unterordnung *Corynebacterineae* und der Familie *Nocardiaceae*

Zusammen konnten zwölf Isolate aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen in die Unterordnung *Corynebacterineae* und die Familie *Nocardiaceae* eingeordnet werden. Die Unterordnung *Corynebacterineae* umfaßt die Gattungen *Nocardia* (1 Isolat), *Rhodococcus* (6 Isolate), *Gordona*, *Mycobacterium* (2 Isolate) und *Corynebacterium* (1 Isolat), daneben auch *Dietzia*, *Tsukamurella* und *Turicella*. Die Familie *Nocardiaceae* wird von den Gattungen *Nocardioides* (1 Isolat) und *Aeromicrobium* (2 Isolate) gebildet.

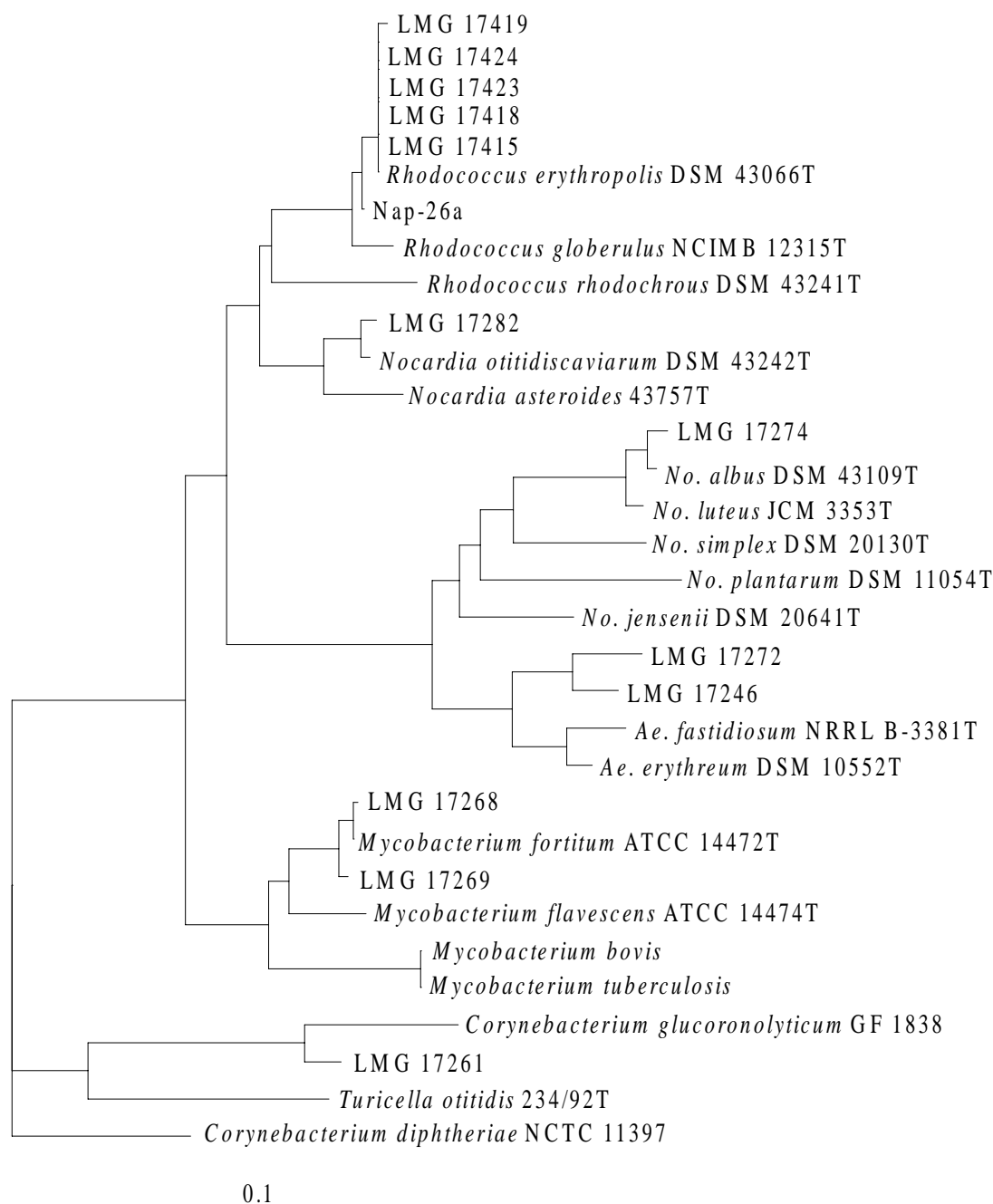


Abb. 3.23: Phylogenetischer Stammbaum zur Einordnung ausgewählter Umweltisolate, beruhend auf der Sequenzierung der nahezu vollständigen 16S rRNA-Gene. Im Baum sind nur repräsentative Vertreter im Bereich der Unterordnung *Corynebacterineae* und der Familie *Nocardiaceae* dargestellt. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10%.

Die größte Anzahl der Isolate in diesem phylogenetischen Bereich konnte der Gattung *Rhodococcus* zugeordnet werden. Die Stämme LMG 17415, 17418, 17419, 17423, 17424 und Nap-26a waren durch eine sehr hohe 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit oder sogar –identität gekennzeichnet. Sie alle wiesen zudem einen hohen Verwandtschaftsgrad zu *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066T auf (~99.8%). Große Sequenzähnlichkeiten wurden weiterhin für die Stämme LMG 17268 und 17269 zu *Mycobacterium fortitum* ATCC 14472 (99.7 bzw. 99.2%), sowie LMG 17282 zu *Nocardia otitidiscaviarum* DSM 43242T (99.5%) und LMG 17274 zu *Nocardioides albus* DSM 43109T (98.8%) berechnet. Geringere Verwandtschaftsgrade zu bisher beschriebenen Bakterienarten waren dagegen bei den Isolaten LMG 17272 und 17246 mit ca. 96% Sequenzähnlichkeit zu *Aeromicrobium fastidiosum* NRRL B-3381T festzustellen. Auch bei LMG 17261 mit einer Ähnlichkeit der 16S rDNA von 97.1% zu *Corynebacterium glucoronolyticum* GF 1838 ist die Artzugehörigkeit fraglich.

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Die aufgrund der 16S rDNA-Sequenzen erfolgten Identifizierungen lassen sich in weiten Teilen durch die Fettsäurezusammensetzung bestätigen (Tab. 3.44-3.45 und Abb. 3.24). Die erhaltenen Muster der Isolate innerhalb der Gattung *Rhodococcus* waren durch hohe Anteile von 16:0, Octadecensäuren und Tuberculostearinsäure charakterisiert. Da in der aufgebauten Fettsäuredatenbank die Gattung *Rhodococcus* nicht vertreten war, ist eine umfassende Bewertung der Profile schwierig. Ein Vergleich mit der Fettsäurezusammensetzung der beiden Stämme „*Arthrobacter picolinophilus*“ LMG 16262T und *Nocardioides simplex* LMG 16260, welche beide in der Zwischenzeit zu *Rhodococcus erythropolis* reklassifiziert wurden, geben jedoch deutlich Hinweise darauf, daß sich die phylogenetische Gruppierung hier widerspiegelt. Der in die Gattung *Nocardia* eingeordnete Stamm LMG 17428 war mit den *Rhodococcus*-Stämmen assoziiert, enthielt jedoch im Gegensatz zu diesen nicht die diagnostisch wichtige Tuberculostearinsäure und signifikant größere Mengen an Hexadecensäuren. Die phylogenetische Position dieses Stammes blieb unklar, da die 16S rDNA nicht amplifiziert werden konnte. Die als *Aeromicrobium*-Angehörige identifizierten Isolate zeigten auch bei den Fettsäuren das für diese Gattung typische Muster aus unverzweigt-gesättigten Fettsäuren, Octadecensäuren und Tuberculostearinsäure. Eine ähnliche Zusammensetzung wiesen die Isolate innerhalb der Gattung *Mycobacterium* auf. Sie enthielten jedoch zusätzlich Hexadecensäuren und vergleichsweise geringe Mengen an 18:0. Dieses Profil scheint für die Gattung *Mycobacterium* nicht typisch zu sein, da vorangegangene Analysen der Gesamtfettsäuren ergeben hatten, daß sich die Fettsäuren dieser Gattung vorwiegend aus Hexadecensäure, Octadecensäure, TBSA und Eicosanolen

zusammensetzen (Hägglblom et al., 1994; Reischl et al., 1998). Diese Aussagen können nur unter Vorbehalt getroffen werden, da in der hier aufgebauten Datenbank keine entsprechenden Referenzen gespeichert waren.

Der Stamm LMAU AC256 wurde von Antoon Akkermans als *Terrabacter tumescens* weitergegeben. Das Fettsäuremuster unterschied sich hiervon jedoch durch das Fehlen von Hexadecensäuren deutlich. Aufgrund der Fettsäurezusammensetzung wies dieser Stamm die größte Ähnlichkeit zur Gattung *Aeromicrobium* auf.

Die relativ geringe Sequenzähnlichkeit des Stammes LMG 17261 zu den anderen Isolaten dieser Gruppe wurde auch durch die starken Abweichungen im Fettsäureprofil deutlich. Das Bakterium setzte sich von den *Rhodococcus*-Stämmen durch das Fehlen der Tuberculostearinsäure, Octadecensäuren als dominierende Bestandteile und erhebliche Mengen an 15:0a deutlich ab. Die Zusammensetzung entsprach im wesentlichen den Referenzdaten der *Cellulomonas*-Spezies, unterschied sich jedoch von diesen durch die großen Anteile an Octadecensäuren.

Tab. 3.44: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen in die Unterordnung *Corynebacterineae* oder die Familie *Nocardiaceae* eingeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1ω8i | 18:2ω6,9 | sum2 | sum3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|---------|----------------|-----------------|-------|-------|------|-------|------|------|-------|-------|------|---------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| 17246 | - ^d | tr ^c | - | tr | tr | - | tr | 17.3 | - | tr | 1.1 | - | - | 27.6 | tr | 36.9 | 14.3 | tr | - |
| 17272 | - | tr | - | tr | tr | tr | tr | 17.2 | tr | tr | 2.4 | - | - | 32.6 | 1.1 | 28.1 | 10.5 | tr | - |
| AC256 | - | tr | - | tr | tr | - | tr | 36.7 | - | tr | tr | - | - | 48.9 | 1.1 | 4.1 | 7.0 | - | - |
| 17268 | - | tr | - | tr | tr | - | 13.1 | 34.7 | - | tr | tr | tr | tr | 26.1 | tr | 3.0 | 19.9 | tr | - |
| 17269 | - | 2.5 | - | tr | tr | - | 12.7 | 40.4 | - | tr | tr | tr | tr | 28.9 | tr | 2.1 | 10.6 | tr | - |
| 17261 | tr | tr | tr | 10.6 | tr | 1.2 | tr | 25.2 | tr | 4.7 | tr | - | - | 52.5 | tr | 1.6 | tr | - | - |
| 17274 | tr | tr | 2.0 | tr | tr | 28.6 | 5.5 | 7.7 | 4.5 | 8.0 | 6.6 | tr | - | 18.9 | 2.4 | 7.4 | 2.1 | tr | tr |
| 17282 | - | tr | - | tr | tr | - | 19.9 | 17.2 | - | - | tr | tr | - | 10.4 | - | 1.3 | 43.9 | tr | - |
| 17415 | - | 5.2 | - | tr | 2.0 | - | 7.8 | 23.5 | tr | 2.0 | 2.1 | 1.7 | - | 14.2 | 1.5 | 2.0 | 26.3 | 5.1 | tr |
| 17418 | - | 2.6 | tr | tr | 1.1 | tr | 4.2 | 22.3 | tr | tr | 1.2 | 1.5 | tr | 7.7 | 2.9 | 1.9 | 39.4 | 4.9 | tr |
| 17419 | - | 3.4 | - | tr | 1.6 | - | 5.1 | 26.5 | - | 1.8 | 2.2 | 1.7 | - | 14.2 | 1.1 | 2.1 | 29.6 | 5.5 | tr |
| 17423 | - | 3.6 | - | tr | 1.0 | - | 2.4 | 22.4 | tr | tr | 1.2 | 1.4 | tr | 4.9 | 3.1 | 1.8 | 38.0 | 3.6 | tr |
| 17424 | - | 1.2 | - | - | tr | - | 2.8 | 17.8 | tr | tr | 1.2 | 1.4 | tr | 6.2 | 3.2 | 2.1 | 43.7 | 4.1 | tr |
| 17428 | - | 1.4 | - | tr | - | - | 6.7 | 30.0 | - | - | - | - | - | - | 30.7 | 6.7 | - | tr | - |
| Nap-26a | - | 4.6 | - | tr | 1.6 | tr | 5.3 | 26.0 | tr | 2.6 | 2.9 | tr | tr | 33.3 | 2.4 | 4.6 | 2.7 | - | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Stämme enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: LMG 17272 enthielt zusätzlich 20:0 (2.0%); LMG 17423 enthielt zusätzlich c17:1ω6/17:0 d7,8 (2.5%) und LMG 17428 enthielt zusätzlich 19:0 d8,9 (7.2%) und 20:1ω9 (8.7%) und Nap-26a enthielt zusätzlich c17:1ω6/17:0 d7,8 (1.9%), 20:1ω9 (1.4%) und 20:0 (1.9%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1ω6/t18:1ω9/ t18:1ω12 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.45: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen in die Unterordnung *Corynebacterineae* oder die Familie *Nocardiaceae* eingeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2ω6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|---------|-----------------|----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| 17246 | tr ^c | - ^d | 2.9 | - | tr | tr | tr | tr | 17.5 | - | tr | - | 1.4 | - | tr | 31.2 | tr | 36.0 | - | tr | tr |
| 17272 | tr | tr | 11.4 | tr | 3.1 | tr | 1.9 | tr | 26.6 | tr | 4.3 | - | 1.1 | tr | 1.6 | 23.3 | tr | 16.8 | - | tr | - |
| AC256 | tr | - | 2.1 | - | tr | tr | tr | tr | 29.9 | 3.8 | tr | - | tr | - | tr | 36.5 | 1.1 | 10.4 | 8.1 | 2.4 | tr |
| 17268 | 2.8 | - | 4.8 | - | tr | tr | - | 5.7 | 29.0 | - | tr | tr | tr | - | tr | 21.0 | tr | 8.8 | - | tr | 1.6 |
| 17269 | 2.0 | - | 3.8 | - | tr | tr | - | 7.4 | 28.0 | tr | tr | tr | tr | - | tr | 26.8 | tr | 8.4 | tr | tr | 1.7 |
| 17261 | tr | tr | 3.6 | tr | 12.2 | tr | 1.3 | tr | 25.8 | tr | 4.8 | - | tr | tr | tr | 36.6 | tr | 2.1 | - | tr | - |
| 17274 | 1.5 | tr | 8.6 | 1.6 | tr | tr | 20.2 | 3.3 | 17.6 | 2.6 | 4.4 | tr | 4.5 | tr | 1.1 | 18.6 | 1.5 | 8.1 | - | tr | tr |
| 17282 | tr | - | 3.4 | - | tr | tr | - | 2.7 | 28.1 | - | 1.8 | - | 1.2 | - | tr | 28.3 | tr | 9.8 | tr | tr | tr |
| 17415 | - | tr | 1.8 | 5.6 | 16.6 | tr | 3.3 | - | 26.6 | 11.5 | 10.3 | - | tr | tr | tr | 5.4 | tr | 6.1 | - | tr | - |
| 17418 | 2.2 | - | 8.6 | tr | tr | tr | tr | 1.1 | 22.7 | tr | 1.3 | tr | 1.3 | - | tr | 7.9 | tr | 14.1 | 5.6 | 1.3 | tr |
| 17419 | 5.9 | - | 11.9 | - | tr | tr | - | 2.4 | 23.5 | - | 1.3 | tr | 1.5 | - | tr | 14.4 | tr | 7.4 | 7.9 | 2.9 | tr |
| 17423 | 2.6 | - | 7.8 | tr | 1.8 | tr | tr | 1.0 | 22.2 | tr | 5.3 | tr | 1.2 | - | tr | 6.1 | 1.4 | 13.9 | 3.4 | tr | tr |
| 17424 | 1.8 | - | 4.5 | tr | tr | tr | tr | 1.2 | 16.4 | tr | 1.5 | tr | 1.4 | - | tr | 2.3 | tr | 13.7 | 2.8 | tr | 1.2 |
| 17428 | tr | tr | tr | 3.0 | 38.5 | tr | 4.2 | - | 7.5 | 2.5 | 40.6 | - | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| Nap-26a | 1.9 | tr | 4.5 | tr | 8.7 | tr | 7.2 | tr | 8.0 | 1.8 | 45.7 | - | tr | 1.3 | tr | 3.4 | tr | 2.8 | tr | 1.6 | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. Die folgenden Stämme enthielten zusätzlich signifikante Mengen anderer Fettsäuren: LMG 17268 enthielt zusätzlich 2-OH 16:0 (4.5%) und 20:0 (1.8%); LMG 17269 enthielt zusätzlich 2-OH 16:0 (6.3%) und 20:0 (1.5%) und LMG 17282 enthielt zusätzlich 20:1ω9 (3.0%), 22:1ω9 (3.5%) und 24:1ω9 (4.9%); LMG 17415 enthielt zusätzlich 20:0 (2.3%) und 22:0 (3.7%); LMG 17418 enthielt zusätzlich 3-OH 11:0 (2.9%), 20:0 (7.4%) und 22:0 (13.4%); LMG 17423 enthielt zusätzlich 19:0 d8,9 (1.5%), 20:0 (7.7%) und 22:0 (12.1%) und Nap-26a enthielt zusätzlich 18:0i (1.3%) und 19:1ω9 (1.6%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

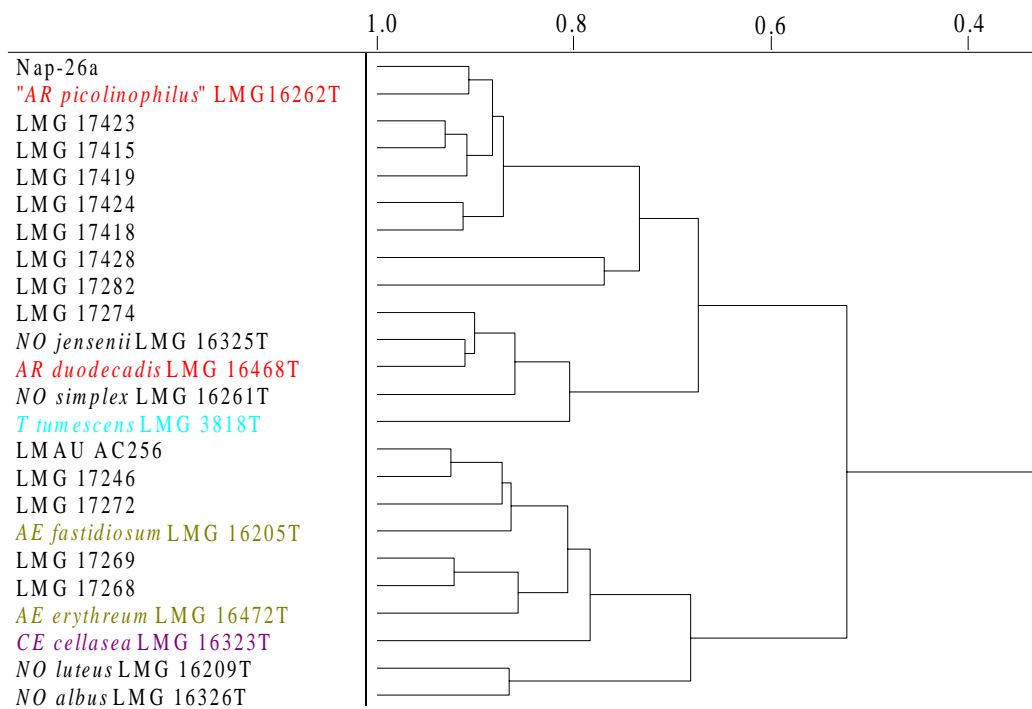


Abb. 3.24: Dendrogramm, welches die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb ausgewählter Umweltisolate, basierend auf den Fettsäuren der Phospholipide, zeigt. Die Isolate wurden zuvor aufgrund von 16S rDNA-Ähnlichkeiten in die Unterordnung *Corynebacterineae* bzw. die Familie *Nocardiaceae* eingeordnet. Zur besseren Orientierung wurden bei der Berechnung des Dendrogramms zusätzlich die Typstämme aller analysierten Referenzorganismen berücksichtigt. Es ist nur der für die Isolate relevante Bereich abgebildet.

3.12.4 Isolate innerhalb der Gattung *Arthrobacter*

Vier Isolate konnten anhand der durchgeführten phylogenetischen Analysen in die Gattung *Arthrobacter* eingeordnet werden (Abb. 3.25).

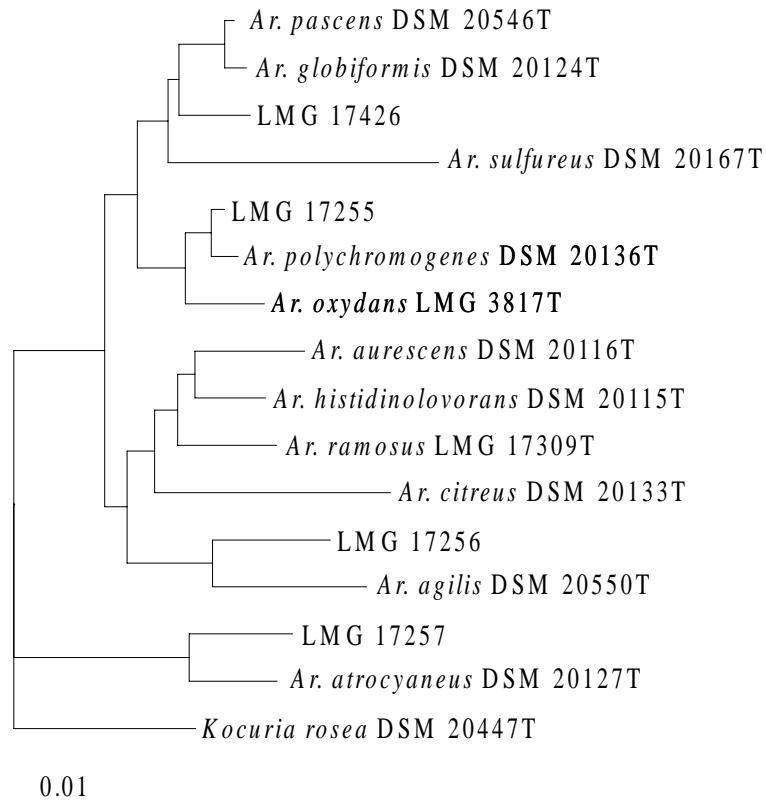


Abb. 3.25: Phylogenetischer Stammbaum zur Einordnung ausgewählter Umweltisolate, beruhend auf der Sequenzierung des nahezu vollständigen 16S rRNA-Gens. Im Baum sind nur Vertreter im Bereich der Gattung *Arthrobacter* dargestellt, *Kocuria rosea* diente als *outgroup*. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 1%.

Die beiden Stämme LMG 17255 und 17426 zeigten dabei recht hohe Sequenzähnlichkeiten zu beschriebenen Arten der Gattung mit 99.5% zu *Ar. oxydans* DSM 20119T bzw. 98.6% zu *Ar. globiformis* DSM 20124T. Eigene Zweige innerhalb der *Arthrobacter* bildeten die Stämme LMG 17256 und 17257, wobei die niedrigen Verwandtschaftsgrade zu bekannten Arten der Gattung *Arthrobacter* auf neue Arten hinweisen könnten.

Fettsäurezusammensetzung der polaren Lipidfraktionen

Neben den vier phylogenetisch analysierten Umweltisolaten konnten aufgrund der Fettsäurezusammensetzung weitere elf Stämme der Gattung *Arthrobacter* zugeordnet werden. Diese hatten schon im Rahmen vorangegangener Arbeiten von Antoon Akkermans die größten Ähnlichkeiten zu dieser Gattung aufgewiesen. Die Isolate waren durch große Anteile der Fettsäuren 15:0a und 17:0a gekennzeichnet (Abb. 3.46-3.47). Daneben wurden prominente Mengen an 16:0 detektiert. In geringeren Anteilen lagen hingegen die iso-verzweigten Fettsäuren 15:0i, 16:0i und 17:0i vor. Dieses Fettsäureprofil reiht sich in das Bild der *Arthrobacter*-Referenzstämme ein. Eine Ausnahme bildete der Stamm LMG 17257. Er wich von dem allgemeinen Muster insbesondere durch den auffällig hohen Anteil an 16:0 ab. Dieses Merkmal deutet auf eine enge Verwandtschaft mit Vertretern der Gattung *Cellulomonas* hin.

Tab. 3.46: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Phospholipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen die der phylogenetische Umgebung der Gattung *Arthrobacter* zugeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | 17:0 | 18:1ω8i | 18:2ω6,9 | sum2 | sum 3 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|---------|-----------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|---------|----------|------|-------|------|------------|--------|------|
| 17255 | tr ^c | tr | 7.0 | 35.2 | tr | 6.0 | tr | 14.4 | 4.0 | 29.9 | tr | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| 17256 | tr | tr | 19.0 | 38.1 | - | 1.6 | tr | 8.0 | 7.2 | 23.5 | - | - | - | tr | - | 1.3 | - | tr | - |
| 17257 | - ^d | tr | 1.6 | 6.5 | tr | tr | 2.1 | 30.6 | tr | 5.2 | tr | - | - | 47.6 | 1.8 | tr | - | tr | - |
| 17426 | tr | tr | 3.7 | 42.3 | tr | 3.4 | tr | 10.1 | 3.1 | 29.1 | - | - | - | tr | - | 1.5 | - | tr | 3.1 |
| A17 | tr | 1.5 | 5.8 | 48.4 | tr | 2.6 | tr | 14.5 | 2.5 | 20.5 | tr | - | - | tr | - | 1.2 | - | tr | 1.5 |
| A104 | tr | 1.6 | 6.2 | 45.8 | 1.1 | 3.6 | tr | 15.6 | 2.8 | 18.5 | tr | - | - | tr | - | 1.5 | - | tr | 1.5 |
| AC8 | tr | 1.0 | 13.5 | 39.9 | tr | 2.8 | tr | 10.0 | 8.4 | 20.4 | - | - | - | tr | - | 1.0 | - | tr | tr |
| AC16 | tr | 1.2 | 5.6 | 43.8 | tr | 1.9 | tr | 10.8 | 4.2 | 22.8 | - | - | - | tr | - | 1.4 | - | tr | 5.2 |
| AC159 | tr | tr | 4.0 | 52.6 | tr | 3.0 | tr | 7.0 | 1.6 | 22.8 | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | 4.5 |
| AC166 | tr | 1.3 | 5.2 | 38.5 | tr | 6.4 | tr | 11.5 | 4.3 | 28.8 | tr | - | - | tr | - | 1.0 | - | tr | tr |
| AC169 | tr | tr | 8.3 | 31.7 | tr | tr | tr | 4.0 | 4.5 | 7.1 | 1.1 | - | tr | 3.6 | tr | 12.9 | - | 4.1 | 3.9 |
| AC206 | tr | 1.9 | 6.3 | 39.6 | tr | 7.0 | tr | 10.7 | 5.3 | 24.3 | tr | - | - | tr | - | 1.1 | - | tr | tr |
| AC543 | tr | tr | 9.8 | 61.3 | - | 5.9 | tr | 3.7 | 1.2 | 13.0 | - | - | - | tr | - | 2.5 | - | tr | tr |
| AC544 | tr | tr | 6.4 | 66.4 | tr | 4.0 | - | 4.5 | 1.1 | 14.8 | tr | - | - | - | - | tr | - | tr | - |
| AC846 | tr | 1.0 | 2.7 | 73.2 | tr | 1.4 | tr | 5.7 | tr | 8.2 | tr | - | tr | tr | tr | 4.5 | - | tr | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. *Ar. globiformis* LMAU AC169 enthielt zusätzlich den unbekannten FAME (ECL 18.586) (4.4%) und 20:0 (10.1%).

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:

sum2 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum3 = c18:1ω6/t18:1ω9/ t18:1ω12 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

Tab. 3.47: Fettsäurezusammensetzung [Fläche %] der Glykolipidfraktionen derjenigen Umweltisolate, die aufgrund ihrer 16S rDNA-Sequenzen die der phylogenetischen Umgebung der Gattung *Arthrobacter* zugeordnet wurden.^a

| LMG Nr. | 12:0 | 14:0i | 14:0 | 15:0i | 15:0a | 15:0 | 16:0i | sum1 ^b | 16:0 | 17:0i | 17:0a | sum2 | 17:0 | 18:0i | 18:2ω6,9 | sum3 | sum4 | 18:0 | 10-Me 18:0 | 19:1ω8 | 19:0 |
|---------|-----------------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|------|-------|-------|------|------|-------|----------|------|------|------|------------|--------|------|
| 17255 | 1.4 | tr | 1.5 | 6.6 | 33.6 | tr | 4.7 | tr | 7.7 | 4.3 | 37.3 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| 17256 | - ^d | - | tr | 16.8 | 35.3 | - | 1.1 | - | 4.0 | 6.1 | 34.3 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | - |
| 17257 | 1.0 | tr | 3.6 | 3.1 | 11.1 | tr | 1.3 | 1.3 | 24.0 | 2.0 | 16.2 | - | tr | - | tr | 28.1 | tr | 1.4 | - | tr | - |
| 17426 | - | tr | tr | 2.8 | 36.6 | tr | 2.6 | - | 6.1 | 3.1 | 43.4 | tr | - | tr | - | tr | - | 1.3 | - | tr | 1.4 |
| A17 | 1.4 | tr | 2.8 | 4.7 | 46.1 | tr | 3.6 | - | 8.1 | 1.1 | 28.4 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | 1.0 |
| A104 | 4.5 | tr | 3.2 | 5.0 | 46.3 | tr | 4.0 | - | 7.4 | tr | 24.5 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | 1.0 |
| AC8 | 4.4 | tr | 2.3 | 10.6 | 35.4 | tr | 2.8 | tr | 6.8 | 5.9 | 27.8 | tr | - | tr | tr | tr | - | tr | - | tr | tr |
| AC16 | tr ^c | tr | 2.9 | 5.0 | 36.8 | tr | 2.6 | tr | 8.2 | 2.6 | 35.2 | tr | - | - | - | tr | - | tr | - | tr | 3.3 |
| AC159 | 1.7 | tr | 3.4 | 2.7 | 47.4 | - | 2.2 | tr | 6.5 | 1.4 | 28.8 | tr | - | tr | tr | 1.4 | - | 1.5 | - | tr | 1.8 |
| AC166 | 2.0 | tr | 2.2 | 4.4 | 36.7 | tr | 6.9 | - | 6.1 | 1.9 | 35.5 | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| AC169 | 3.6 | tr | 2.0 | 9.8 | 25.4 | tr | tr | tr | 3.8 | 4.4 | 8.6 | - | 1.0 | tr | tr | 2.3 | tr | 12.7 | - | 4.1 | 3.8 |
| AC206 | 2.5 | tr | 3.8 | 4.6 | 31.6 | tr | 7.7 | tr | 7.9 | 2.9 | 33.2 | - | tr | tr | tr | 1.2 | - | 1.5 | - | tr | tr |
| AC543 | 3.9 | tr | 4.1 | 8.0 | 48.1 | tr | 7.2 | - | 4.8 | 2.5 | 18.3 | - | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr |
| AC544 | 1.6 | tr | 4.2 | 5.6 | 51.2 | tr | 4.7 | - | 6.4 | 1.9 | 19.9 | - | tr | tr | - | tr | - | 1.2 | - | tr | tr |
| AC846 | 3.2 | tr | 6.7 | 2.5 | 61.1 | tr | 1.6 | - | 9.0 | tr | 12.0 | - | - | - | - | tr | - | 1.5 | - | - | tr |

^a Es wurden nur die Fettsäuren mit einem Anteil von mehr als 1% angegeben. *Ar. globiformis* LMAU AC169 enthielt zusätzlich den unbekannten FAME (ECL 18.586) (4.5%), 19:1ω8 (4.1%) und 20:0 (10.0%)

^b Die Fettsäuren c16:1ω7, t16:1ω7 und 16:1ω9 (ECL 15.793) konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt. Des weiteren wurden die folgenden Fettsäuren in der Auswertung zusammen berücksichtigt:
sum2 = 17:0 d7,8/17:1ω6 (ECL 16.835), sum3 = c18:1ω9/18:1ω6 (ECL 17.753), sum4 = c18:1ω7/t18:1ω9/t18:1ω12/c18:1ω9 (ECL 17.798)

^c tr (traces), Spuren (<1%)

^d -, nicht detektiert

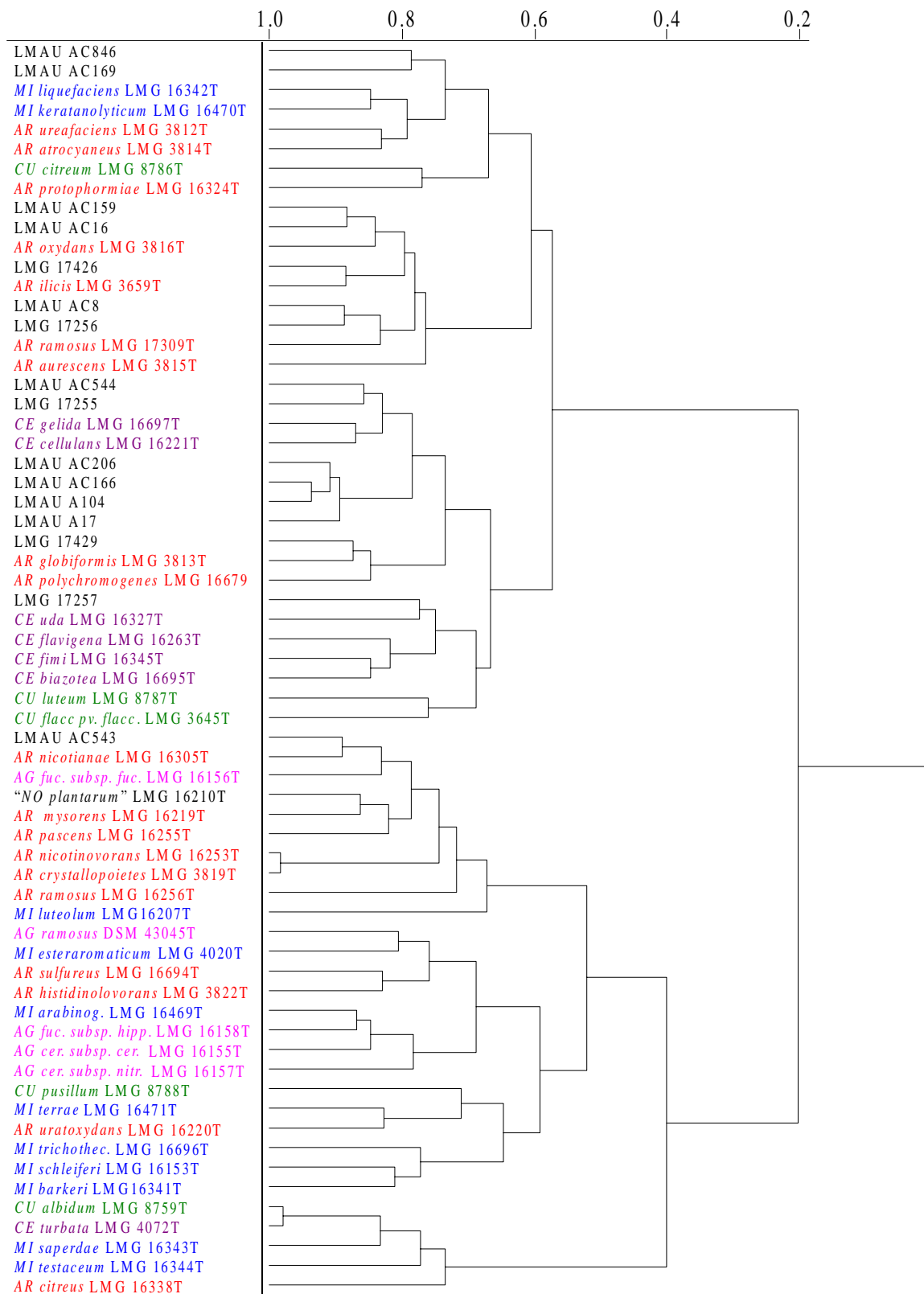


Abb. 3.26: Dendrogramm, welches die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb ausgewählter Umweltisolate, basierend auf den Fettsäuren der Phospholipide, zeigt. Die Isolate wurden zuvor aufgrund von 16S rDNA-Ähnlichkeiten in das phylogenetische Umfeld der Gattung *Arthrobacter* eingeordnet. Zur besseren Orientierung wurden bei der Berechnung des Dendrogramms zusätzlich die Typstämme aller analysierten Referenzorganismen berücksichtigt. Es ist nur der für die Isolate relevante Bereich abgebildet.

3.13 Der Einfluß verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Fettsäurezusammensetzung ausgewählter coryneformer Bakterien

Zweifelsfrei weisen verschiedene Taxa für sie charakteristische Fettsäureprofile (Kates et al., 1964) auf. Daher wurden diese sehr häufig zur mikrobiellen Chemotaxonomie herangezogen. Verschiedene Untersuchungen zeigten jedoch, daß Variationen der Wachstumstemperatur und des –mediums Veränderungen der Fettsäureprofile quantitativer und zu einem geringeren Anteil qualitativer Art hervorriefen (Harwood et al., 1984; Radledge et al., 1988). Diese Beobachtungen führten daher zu Zweifeln über die Reproduzierbarkeit und Interpretation von Fettsäuremustern mikrobieller Gemeinschaften in ihren natürlichen Lebensräumen (Tunlid et al., 1992; Haack et al., 1994). Es sollte daher überprüft werden, ob und in welchem Umfang die Fettsäurezusammensetzung coryneformer Bakterien durch verschiedene Wachstumsparameter beeinflußt wird. Hierfür wurden stellvertretend vier Stämme der Gattung *Arthrobacter* und drei Stämme der Gattung *Cellulomonas* ausgewählt, die untereinander durch eine möglichst hohe Variabilität des Fettsäuremusters gekennzeichnet waren. Die Stämme wurden zur Abschätzung des Einflusses des Wachstumsmediums zusätzlich zu dem standardmäßig verwendeten EM auf dem Mineralsalzmedium M9 angezogen. M9 enthielt wie EM eine Glucosekonzentration von 5 g l^{-1} , hierbei jedoch als alleinige Kohlenstoffquelle. Die Überprüfung der Auswirkungen der Wachstumstemperatur auf die Fettsäuresynthese erfolgte durch zusätzliche Anzuchten bei 20° , 12° und 4°C . Diese Versuche wurden in Klimaschränken durchgeführt. Als Medium wurde in allen Fällen EM verwendet. Dies war auch bei der Variation des pH-Wertes der Fall. Als Referenzen dienten bei allen Versuchen die Fettsäurezusammensetzungen, die unter den Standardbedingungen (EM, 30°C , pH 7.0, Ernte nach 72 h) gemessen wurden. Diese Werte sind daher in den nachfolgenden Tabellen 3.48 und 3.49 hervorgehoben dargestellt.

Tab. 3.48: Der Einfluß verschiedener Wachstumsbedingungen auf das Fettsäuremuster von Phospholipidfraktionen ausgewählter Arten der Gattung *Arthrobacter*.

| Fettsäure ^a | Anteil [%] aller Fettsäuren von <i>Ar. globiformis</i> LMG 3813T | | | | | | | Anteil [%] aller Fettsäuren von <i>Ar. nicotianae</i> LMG 16305T | | | | | | |
|------------------------|---|------|-----------------|------|------|---------|------|---|------|-----------------|------|-----------------|---------|------|
| | Medium ^b (30°C) | | Temperatur [°C] | | | pH-Wert | | Medium (30°C) | | Temperatur [°C] | | | pH-Wert | |
| | EM | M9 | 20 | 12 | 4 | 9.0 | 5.5 | EM | M9 | 20 | 12 | 4 | 9.0 | 5.5 |
| 14:0i | tr | tr | tr | tr | 1.4 | tr | tr | tr | tr | 1.7 | 4.7 | NG ^c | 1.1 | 2.0 |
| 14:0 | 1.4 | 1.4 | 1.1 | 1.1 | 1.6 | tr | 1.1 | 1.7 | 1.5 | 1.9 | 2.8 | | tr | tr |
| 15:0i | 8.4 | 1.1 | 4.6 | 7.1 | 4.4 | 4.4 | 5.2 | 15.7 | tr | 21.2 | 1.2 | | 16.0 | 6.1 |
| 15:0a | 45.1 | 45.7 | 48.7 | 48.8 | 60.3 | 49.4 | 53.8 | 46.3 | 56.8 | 49.6 | 68.3 | | 49.1 | 28.1 |
| 15:0 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | | tr | tr |
| 16:0i | 4.5 | 6.2 | 4.9 | 6.8 | 3.2 | 6.0 | 4.6 | 4.5 | 6.3 | 7.8 | 10.8 | | 7.9 | tr |
| 16:1ω7 | tr | tr | - | 1.2 | 10.9 | - | - | - | - | - | tr | | - | - |
| 16:0 | 13.6 | 13.7 | 14.5 | 14.7 | 1.6 | 11.6 | 12.2 | 7.7 | 12.4 | 6.1 | 5.0 | | 3.8 | 1.1 |
| 17:0i | 4.0 | tr | 2.0 | 2.8 | tr | 2.0 | 1.7 | 4.3 | tr | 2.1 | - | | 3.3 | 1.4 |
| 17:0a | 17.1 | 27.0 | 21.1 | 14.2 | 5.0 | 23.6 | 19.6 | 18.1 | 20.7 | 9. | 6.1 | | 17.7 | 2.8 |
| 18:0 | 1.3 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | | tr | 7.8 |
| 20:0 | | | | | | | | - | - | - | - | | - | 31.5 |

| Fettsäure ^a | Anteil [%] aller Fettsäuren von <i>Ar. nicotinovorans</i> LMG 16253T | | | | | | | Anteil [%] aller Fettsäuren von <i>Ar. uratoxydans</i> LMG 16220T | | | | | | |
|------------------------|---|------|-----------------|------|------|---------|------|--|------|-----------------|------|----|---------|------|
| | Medium ^b (30°C) | | Temperatur [°C] | | | pH-Wert | | Medium (30°C) | | Temperatur [°C] | | | pH-Wert | |
| | EM | M9 | 20 | 12 | 4 | 9.0 | 5.5 | EM | M9 | 20 | 12 | 4 | 9.0 | 5.5 |
| 14:0i | - | tr | tr | tr | tr | tr | tr | - | 1.3 | tr | tr | NG | tr | tr |
| 14:0 | - | tr | tr | tr | tr | tr | tr | - | tr | tr | tr | | tr | tr |
| 15:0i | 5.3 | tr | 4.1 | 2.7 | 1.2 | 2.3 | 3.1 | 8.6 | 7.9 | 15.3 | 1.1 | | 19.6 | 23.6 |
| 15:0a | 75.5 | 45.3 | 64.4 | 82.8 | 89.9 | 38.4 | 67.2 | 26.1 | 49.1 | 49.8 | 73.7 | | 41.6 | 34.7 |
| 15:0 | - | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | | tr | tr |
| 16:0i | 2.2 | 7.9 | 3.0 | 2.3 | tr | 2.5 | 2.3 | 5.7 | 8.3 | 6.0 | 4.9 | | 4.9 | 5.6 |
| 16:1ω7 | - | 6.0 | - | tr | tr | 11.3 | - | - | - | - | - | | - | - |
| 16:0 | 3.1 | 7.6 | 3.4 | 1.7 | 1.2 | 12.1 | 3.2 | 8.5 | 4.8 | 4.0 | 5.9 | | 3.2 | 1.4 |
| 17:0i | 1.2 | tr | 2.2 | tr | - | 1.3 | 1.1 | 10.4 | 2.2 | 4.1 | - | | 8.3 | 12.1 |
| 17:0a | 12.8 | 19.9 | 20.6 | 5.6 | 1.5 | 17.0 | 20.8 | 36.5 | 24.8 | 19.0 | 12.0 | | 20.9 | 21.6 |
| sum1 | - | 6.9 | - | 1.5 | 1.2 | 11.1 | tr | | | | | | | |
| 18:0 | - | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 1.3 | tr | tr | tr | | tr | tr |

^a Es sind nur die Fettsäuren aufgeführt, die einen höheren Anteil als 1% an der Gesamtheit der Fettsäuren darstellen.

^b Die Bakterienstämme wurden in Flüssigmedium angezogen und nach 72h in der spätexponentiellen Phase geerntet.

^c M9 enthielt analog zu EM 5.0 g Glucose l⁻¹ als Kohlenstoffquelle.

^d NG, kein Wachstum unter diesen Bedingungen

^e Die Fettsäuren c18:1ω9 und 18:1ω6 konnten nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Sie sind daher unter sum1 zusammengefaßt.

Die Fettsäuremuster, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gebildet wurden, zeigten bei den Stämmen *Ar. globiformis* LMG 3813T und *Ar. uratoxydans* LMG 16220T vor allem quantitative Unterschiede, während bei *Ar. nicotianae* LMG 16305T und *Ar. nicotinovorans* LMG 16253T zusätzlich qualitative Verschiebungen auftraten. Gerade das Fettsäureprofil von *Ar. nicotianae* LMG 16305T scheint von den jeweils vorliegenden Wachstumsbedingungen stark abhängig zu sein. Allgemeine Trends für die Veränderung des Fettsäureprofils von Arthrobakterien sind nur schwer zu formulieren. Niedrige Wachstumstemperaturen führten zu einer verminderten Bildung von 16:0, 17:0a und 17:i,

gleichzeitig stieg dagegen der Anteil von 15:0a an. Der Wechsel von EM zu M9 als Wachstumsmedium hatte eine Reduzierung von 15:0i und 17:0i zur Folge, 16:0i wurde verstärkt synthetisiert. Während die Veränderung des pH-Wertes auf die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide der beiden Stämme *Ar. globiformis* LMG 3813T und *Ar. uratoxydans* LMG 16220T fast keinen Einfluß hatte, reagierten die Stämme *Ar. nicotianae* LMG 16305T und *Ar. nicotinovorans* LMG 16253T mit relativ starken quantitativen Verschiebungen auf diese Bedingungen.

Tab. 3.49: Der Einfluß verschiedener Wachstumsbedingungen auf das Fettsäuremuster von Phospholipidfraktionen ausgewählter Arten der Gattung *Cellulomonas*.

| Fettsäure ^a | Anteil [%] aller Fettsäuren von <i>Ce. cellulans</i> LMG 16221T | | | | | | | Anteil [%] aller Fettsäuren von <i>Ce. flavigena</i> LMG 16263T | | | | | | |
|------------------------|--|------|-----------------|------|------|---------|------|--|------|-----------------|----|----|---------|-----|
| | Medium ^b (30°C) | | Temperatur [°C] | | | pH-Wert | | Medium (30°C) | | Temperatur [°C] | | | pH-Wert | |
| | EM | M9 | 20 | 12 | 4 | 9.0 | 5.5 | EM | M9 | 20 | 12 | 4 | 9.0 | 5.5 |
| 14:0i | 2.2 | 1.8 | 2.3 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | NG | NG | tr | NG |
| 14:0 | 2.4 | 10.6 | 2.7 | 2.2 | 1.5 | 4.1 | 1.6 | 10.2 | 6.7 | 10.7 | | | 12.6 | |
| 15:1ω7a | - | - | - | - | 8.4 | - | - | 2.0 | - | 12.2 | | | - | |
| 15:0i | 3.3 | tr | 3.1 | 12.1 | 16.8 | 25.6 | 7.6 | tr | tr | tr | | | 1.3 | |
| 15:0a | 40.3 | 69.5 | 43.7 | 45.1 | 37.3 | 32.4 | 43.6 | 40.6 | 27.0 | 37.1 | | | 53.9 | |
| 15:0 | 2.8 | 6.3 | 1.6 | 2.7 | 1.3 | tr | tr | 2.6 | 2.5 | 2.8 | | | 2.0 | |
| 16:0i | 20.6 | 2.1 | 22.6 | 16.8 | 11.2 | 5.0 | 7.6 | tr | tr | tr | | | tr | |
| 16:0 | 17.3 | 7.5 | 15.5 | 11.4 | 9.9 | 17.0 | 12.0 | 35.6 | 30.1 | 29.5 | | | 22.2 | |
| 17:0i | tr | - | tr | tr | 1.7 | 4.1 | 1.2 | tr | tr | - | | | tr | |
| 17:0a | 8.4 | tr | 7.3 | 7.6 | 7.0 | 9.1 | 21.5 | 5.3 | 2.9 | 4.4 | | | 5.0 | |
| 18:0 | tr | tr | tr | tr | 1.2 | 1.0 | tr | tr | 6.5 | tr | | | tr | |

| Fettsäure ^a | Anteil [%] aller Fettsäuren von <i>Ce. uda</i> LMG 16327T | | | | | | |
|------------------------|---|------|-----------------|----|----|---------|------|
| | Medium (30°C) | | Temperatur [°C] | | | pH-Wert | |
| | EM | M9 | 20 | 12 | 4 | 9.0 | 5.5 |
| 14:0i | tr | tr | 1.3 | NG | NG | tr | 5.3 |
| 14:0 | 1.8 | 4.7 | 2.0 | | | 2.3 | tr |
| 15:1ω7a | tr | - | 8.6 | | | - | - |
| 15:0i | 2.0 | tr | 5.3 | | | 4.0 | 6.6 |
| 15:0a | 15.3 | 36.1 | 33.2 | | | 35.9 | 27.2 |
| 15:0 | - | 7.5 | tr | | | tr | tr |
| 16:0i | 4.4 | 6.4 | 10.0 | | | 7.6 | 1.3 |
| 16:0 | 48.5 | 25.2 | 28.3 | | | 23.7 | 2.7 |
| 17:0i | 1.6 | tr | 1.1 | | | 1.6 | 1.4 |
| 17:0a | 18.7 | 7.1 | 8.2 | | | 21.7 | 1.7 |
| 18:0 | 4.9 | 2.8 | tr | | | 1.3 | 14.9 |
| 20:0 | - | tr | - | | | - | 29.5 |

^a Es sind nur die Fettsäuren aufgeführt, die einen höheren Anteil als 1% an der Gesamtheit der Fettsäuren darstellen.

^b Die Bakterienstämme wurden in Flüssigmedium angezogen und nach 72h in der spätexponentiellen Phase geerntet.

^c M9 enthielt analog zu EM 5.0 g Glucose l⁻¹ als Kohlenstoffquelle.

^d NG, kein Wachstum unter diesen Bedingungen.

Die Tabelle 3.48 verdeutlicht, daß *Cellulomonas*-Stämme keine hohe Toleranz gegenüber einer Absenkung der Wachstumstemperatur aufwiesen. Nur *Ce. cellulans* LMG 16221T zeigte noch ein Wachstum bei Temperaturen unter 20°C. Wie bei den Arthrobakterien nahm auch bei den untersuchten Stämmen der Gattung *Cellulomonas* die Fettsäure 16:0 bei geringeren Temperaturen ab; der Effekt war in diesem Fall sogar ausgeprägter. Die veränderten Temperaturbedingungen führten zudem zur Neusynthese von 15:1ω7a. Diese Fettsäure scheint eine besondere Rolle bei der Reaktion der Mikroorganismen auf reduzierte Wachstumstemperaturen zu spielen. Analog zu den Arthrobakterien war die Temperatursenkung mit einer Verminderung von 17:0a verbunden. Auswirkungen auf 17:0i waren nicht festzustellen, da diese Fettsäure auch in den Referenzprofilen keinen bedeutenden Anteil aufwies. Während der Wechsel von EM zu M9 als Wachstumsmedium bei der Gattung *Arthrobacter* eine Reduzierung von 15:0i und 17:0i und eine Erhöhung des Anteils von 16:0i zur Folge hatte, bewirkte diese Veränderung bei den *Cellulomonas*-Stämmen eine verminderte Synthese von 16:0 und 17:0. Alle anderen Reaktionen waren stammspezifisch. Die Variation des pH-Wertes hatte bei allen untersuchten *Cellulomonas*-Arten drastische Auswirkungen auf die Fettsäureprofile, allgemeine Regeln hierfür waren jedoch nicht erkennbar.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß zum Teil erhebliche Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung durch die Variation verschiedener Wachstumsparameter hervorgerufen wurden. In den meisten Fällen waren diese Veränderungen quantitativer Natur, jedoch wurden auch qualitative Einflüsse deutlich. Für einige Fettsäuren lassen sich gattungsspezifische Variationen beobachten, insgesamt ist der Einfluß der Wachstumsbedingungen jedoch eher als artspezifisch zu bezeichnen.

3.14 Der Einfluß verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung der intakten polaren Lipide coryneformer Bakterien

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob auch das Muster der intakten polaren Lipide coryneformer Bakterien von den Wachstumsbedingungen abhängig ist. Hierzu wurden die Phospholipidfraktionen massenspektrometrisch im negativen Modus auf ihre Zusammensetzung hin überprüft. Die Analyse der aufgenommenen Spektren zeigte, daß sich die beobachteten Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung in den intakten polaren Lipiden ebenfalls wiederfanden. Wie bei den Fettsäuren waren auch bei den Lipiden sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen in Abhängigkeit von den herrschenden Wachstumsbedingungen festzustellen. Die beobachteten Variationen waren wiederum stammspezifischer Natur, jedoch von geringerem Ausmaß als bei den Fettsäuren. Als Beispiel für die beobachteten Veränderungen sind nachfolgend je zwei Lipidfraktionen eines *Arthrobacter*- und eines *Cellulomonas*-Stammes abgebildet. Die Lipidfraktionen A wurden in M9 bei 30°C, Fraktionen B in EM bei 20°C gebildet.

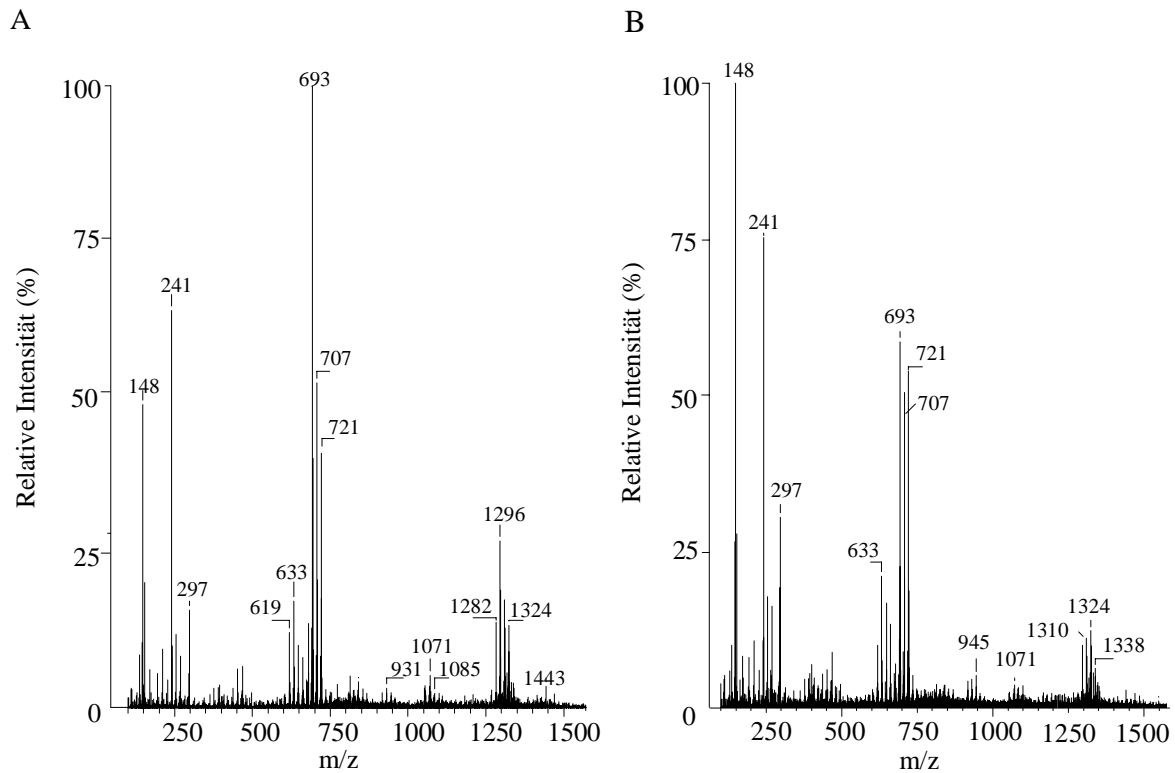


Abb. 3.27: (-)-FAB-MS der Phospholipidfraktionen von *Arthrobacter nicotianae* LMG 16305T nach Anzucht in den Medien EM bei 20°C (A) und M9 bei 30°C (B).

Im Fall von *Arthrobacter nicotianae* LMG 16305T war festzustellen, daß alle Lipidtypen, die bei 20°C in EM synthetisiert wurden, auch bei der Anzucht in einem Minimalmedium und bei höheren Temperaturen gebildet wurden. Es ergaben sich nur leichte quantitative Verschiebungen, die durch Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung hervorgerufen wurden.

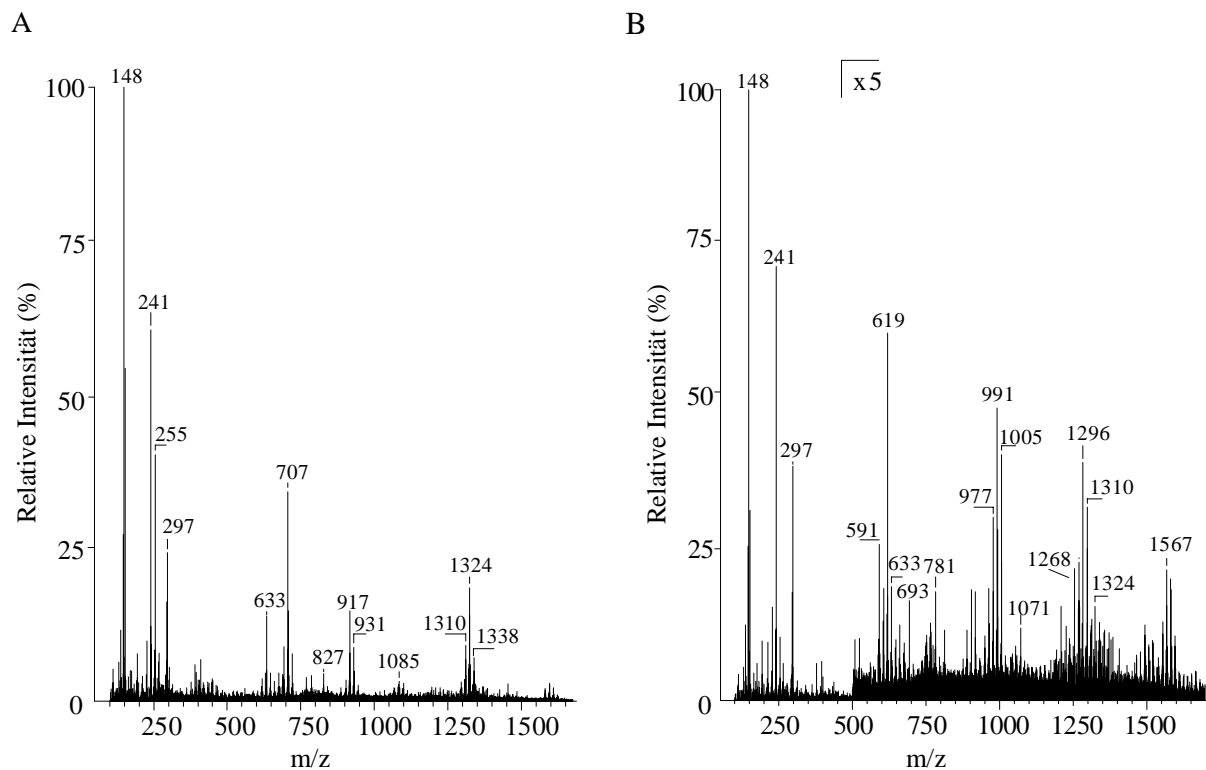


Abb. 3.28: Unterschiede in der Zusammensetzung der Phospholipidfraktionen von *Cellulomonas cellulans* LMG 16253T nach Anzucht in den Medien EM bei 20°C (A) und M9 bei 30°C (B).

Cellulomonas cellulans LMG 16221T reagierte hingegen mit starken Regulationen der Lipidsynthese auf die Variation der Wachstumsparameter Temperatur und Medium. Ein Vergleich der beiden Spektren zeigte nahezu keine Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Phospholipidfraktionen. Ganz offensichtlich fand bei diesem Stamm eine Synthese anderer Lipidtypen (z. B. von Phosphatidylglycerinen) in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen statt. Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die intakten Phospholipide der analysierten Stämme der Gattung *Cellulomonas* einer stärkeren Regulation als die der *Arthrobacter*-Stämme unterlagen.

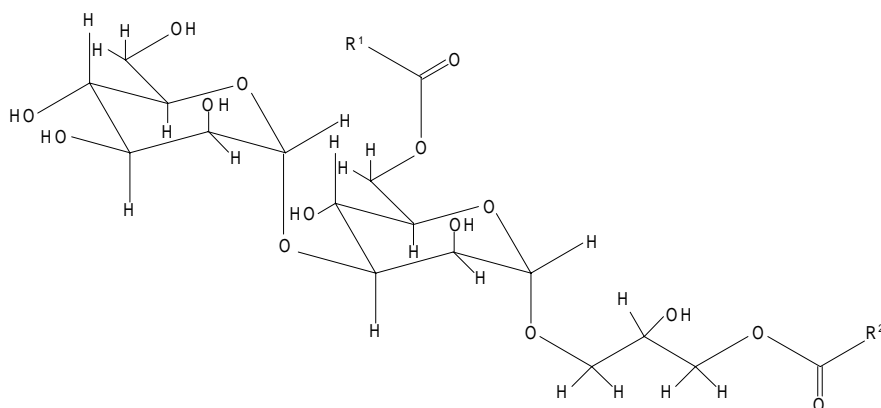
3.15 Identifizierung potentieller Lipidbiomarker

Die Analyse der polaren Lipidfraktionen der coryneformen Bakterien führte zu einem zu Spektren, die eine schnelle Voreinteilung der Organismen ermöglichte, aber auch zur Identifizierung von Verbindungen, die vorher in der Literatur noch nicht beschrieben worden waren. Die Aufklärung der Struktur erfolgte dabei durch den kombinierten Einsatz der NMR-Spektroskopie, welche zur Bestimmung der Struktur und Konfiguration des Lipidgerüsts genutzt wurde, sowie der Tandem-Massenspektroskopie, die die notwendigen Informationen über die Struktur und Position der verschiedenen Fettsäuren lieferte. Im folgenden sollen nur zwei Beispiele dieser sogenannten Lipidbiomarker vorgestellt werden, die für die Detektion bestimmter Bakteriengruppen in natürlichen mikrobiellen Lebensgemeinschaften von großem Nutzen sein können. In Kombination mit der Isotopen-Massenspektroskopie sind sie in der Lage, die wichtige Verbindung zwischen der Analyse der Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften zu schaffen (Pelz et al., 1997).

3.15.1 Ein neuer Glykolipidtyp aus *Arthrobacter atrocyaneus*

In dem FAB-MS Spektrum der Glykolipidfraktion aus *Arthrobacter atrocyaneus* fiel ein prominenter Peak bei $m/z = 891$ auf, der von fünf weiteren Molekülen schwächerer Intensität umgeben war ($m/z = 863, 877, 889, 905$ und 919). Die Vermutung lag nahe, daß es sich um eine homologe Reihe desselben Verbindungstyps handelte, wofür auch die Anwesenheit der Carboxylatanionen von C15:0 ($m/z = 241$), C16:0 ($m/z = 255$), und C17:0 ($m/z = 269$) sowie kleinere Mengen an C15:1 ($m/z = 239$) und ($m/z = 267$) sprach. Nachfolgende MS/MS-Studien des Ions $m/z = 891$ zeigten, daß die betreffende Verbindung die beiden Fettsäuren 12-Methyltetradecansäure und 14-Methylhexadecansäure enthielt, da die aus dem Verlust dieser Fettsäuren ($m/z = 649$ und 621) und den korrespondierenden Ketenen ($m/z = 667$ und 639) resultierenden Ionen beobachtet wurden. Damit verblieb für das Grundgerüst eine Masse von 379 amu (atomare Masseneinheiten). Diese Masse ließ auf zwei Hexoseeinheiten schließen, die an ein Glyceringerüst gebunden waren. Diese Vermutung wurde durch das Ion $m/z = 729$ unterstützt, welches durch die Abspaltung einer dehydratisierten Hexoseeinheit erklärt werden konnte. Das FAB-Spektrum konnte keine Informationen bezüglich der Natur der Hexoseeinheiten, der Art der Bindungen zwischen den Einheiten bzw. zum Glyceringerüst und der Position der Acylgruppen liefern. Daher wurde die Glykolipidfraktion für die weitere Strukturaufklärung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Es wurde eine Fraktion isoliert, die nahezu ausschließlich die betreffende Verbindung enthielt. Mit dieser Fraktion wurden zusätzliche detaillierte NMR-Experimente durchgeführt. Ein- und zweidimensionale ^1H COSY-Spektren bestätigten, daß das Molekül zwei Hexosen, Glycerin und Fettsäuren enthielt. Durch HMQC (*heteronuclear multiple-quantum coherence correlation spectroscopy*)- und HMBC-Messungen wurden daraufhin die Positionen aller Protonen und der mit diesen direkt

verbundenen C-Atome geklärt sowie die Bindungsarten zwischen verschiedenen Untereinheiten festgelegt. Diese komplexen NMR-Untersuchungen identifizierten das Glykolipid zweifelsfrei als 1-[α -Mannopyranosyl-1(1 α -3)-(6-O-acyl- α -mannopyranosyl)]-3-O-acylglycerin (Niepel et al., 1997).



| Verbindung | R ¹ | R ² |
|------------|----------------|----------------|
| I | C17:0a | C15:0a |
| II | C15:0a | C15:0a |
| III | C16:0 | C15:0a |
| IV | C17:1 | C15:0a |
| V | C17:0a | C15:1 |
| VI | C17:0a | C16:0 |
| VII | C17:0a | C17:0a |

Abb.3.29: Struktur der neuen Glykolipide aus *Arthrobacter atrocyaneus*.

Die Struktur wurde durch (+)-FAB-MS Spektren bestätigt. Zusätzlich zeigten diese Messungen die ungewöhnlichen Positionen der Fettsäuren in diesem Lipidtyp. 14-Methylhexadecansäure war an Position sn-1 des Glycerinmoleküls und 12-Methyltetradecansäure an Position C-6 der zentralen Mannoseeinheit gebunden.

Dieser Verbindungstyp scheint für coryneforme Bakterien charakteristisch zu sein, da er im Laufe der Untersuchungen in zahlreichen anderen Glykolipidfraktionen der Referenzstämmen nachgewiesen wurde.

3.15.2 Eine neue Fettsäure aus *Corynebacterium* spp.

Der Stamm LMG 3820, bis dato irrtümlicherweise als *Arthrobacter globiformis* klassifiziert, fiel schon durch sein ungewöhnliches Fettsäuremuster auf (s. Kapitel 3.2.1) und zeigte bei der nachfolgenden phylogenetischen Analyse eine identische 16S rDNA-Sequenz zu den beiden Stämmen *Corynebacterium variabilis* LMG 20132T und 20536 (Collins et al., 1987, 1989b). Auch die Zusammensetzung der intakten polaren Lipide dieses Stammes wich deutlich von den anderen coryneformen Referenzorganismen ab. Das (-)-FAB-MS wies neben

Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycerin und Cardiolipinen deprotonierte Molekülionen bei $m/z = 999$, 1011, 1025 und 1039 auf. Auch in diesem Fall lag folglich eine Serie von Molekülen vor, die durch verschiedene Fettsäurekombinationen verursacht wurde. Dies wurde zudem durch die detektierten Carboxylatanionen für C15:0 ($m/z = 241$), C16:0 ($m/z = 255$), C18:1 ($m/z = 281$), und C19:1 ($m/z = 295$) belegt. Während die Fettsäuren C15:0, C16:0 und C18:1 anhand ihres Fragmentierungsmusters identifiziert wurden, konnten die Bruchstücke der 19:1-Fettsäure keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden. Zur Strukturaufklärung dieser Verbindung wurden die Fettsäuren aus der aufgereinigten Fraktion mittels alkalischer Verseifung freigesetzt und massenspektrometrisch analysiert. Die Signalintensitäten der freien Carboxylsäure waren sehr viel höher als die der Carboxylatanionen, die durch Fragmentierung des Moleküls $m/z = 1025$ erzeugt worden waren. Die resultierenden Spektren waren somit wesentlich zuverlässiger zu interpretieren. In der Regel sind Verzweigungspunkte und Doppelbindungen innerhalb von Fettsäuren mit Hilfe von Massenspektren eindeutig zu lokalisieren. Eine gesättigte, methylverzweigte Säure macht sich durch eine Lücke in dem regelmäßigen Fragmentierungsmuster (Signale im Abstand von 14 amu) bemerkbar, während einfachungesättigte Fettsäuren eine Lücke von drei Signalen aufweisen, die durch eine allylische Spaltung hervorgerufen wird. Das Carboxylatanion mit $m/z = 295$ zeigte eine Lücke, die vier Signale geringer Intensität umfaßte und von zwei prominenten Signalen eingerahmt wurde ($m/z = 210$ und 141). Diese Beobachtung deutete auf eine Methylverzweigung in der allylischen Einheit hin. Ob das Fragment bei $m/z = 195$ aus einer vinyllischen Spaltung an der Doppelbindung oder einer Methylabspaltung vom Fragment mit $m/z = 210$ resultierte, blieb zunächst noch unklar. Die allylischen Fragmente deuteten aber darauf hin, daß die Doppelbindung zwischen den Positionen C-10 und 11 vorlag. Um die Position der Methylgruppe festlegen zu können, wurde eine Microhydrierung (H_2/Pd) durchgeführt. Das FAB CID (*collision induced decomposition*)-Spektrum des gesättigten Produkts zeigte deutlich eine Lücke zwischen $m/z = 169$ und 141 und belegte damit, daß die Methylverzweigung an Position C-9 lokalisiert war. Die Kombination dieser Resultate ermöglichte die Identifizierung der unbekannten Fettsäure als 9-Methyl-10-octadecensäure. Abschließend wurde die Konfiguration der Doppelbindung durch NMR-Messungen als *trans* bestimmt. Die *trans*-9-Methyl-10-octadecensäure (Niepel et al., 1998) war bis zu diesem Zeitpunkt in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

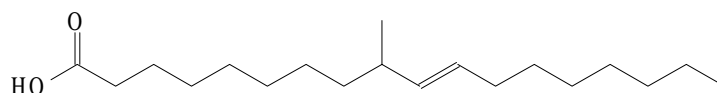


Abb. 3.30: Struktur der neuen Fettsäure.

Um die Struktur des Lipidtyps aufzuklären, an dem die neue Fettsäure gebunden war, wurden eingehende MS-Studien durchgeführt. Im MS/MS-Spektrum des Moleküls mit $m/z = 1025$

wurde neben der aus der Abspaltung der Fettsäuren resultierenden Ionen ein diagnostisch bedeutsames Tochterion mit $m/z = 687$ beobachtet. Dieses wurde daher durch weitere CID-Experimente genauer analysiert. Das Spektrum zeigte das für Glycerinphosphatidylsäuren (GPA) charakteristische Muster (Murphy und Harrison, 1994). Weiterhin wurden prominente Signale der Carboxylationen $m/z = 255$ und 295 registriert, was einen eindeutigen Hinweis darauf lieferte, daß das Fragment n-Hexadecansäure und 9-Methyl-10-octadecensäure enthielt. Die unterschiedlichen Signalintensitäten ermöglichten es, die Bindungsstellen der Fettsäuren festzulegen, da Abspaltungen an Position sn-2 bevorzugt stattfinden und daher zu stärkeren Signalen führen (Murphy und Harrison, 1994). Bei dem Fragment bei $m/z = 687$ handelte es sich somit um 1-(9-Methyl-10-octadecenoyl)-2-hexadecanoyl-GPA. Die Subtraktion dieser Struktureinheit von der molekularen Masse von 1026 ergab eine Differenz von 339 amu. Hierbei war die noch fehlende 18:1-Fettsäure zu berücksichtigen (281 amu), so daß letztendlich noch 58 amu verblieben. Diese Masse ließ auf ein an zwei Positionen verestertes Glycerinmolekül mit einer freien Hydroxylgruppe schließen. Diese Vermutung wurde durch die Zunahme des Molekulargewichtes auf 1068 bei der nachfolgend durchgeführten Acetylierung unterstützt, was der Aufnahme einer Acetylgruppe entsprach. Zusätzliche NMR-Studien bestätigten die Natur und das Substitutionsmuster der beiden Glycerinmoleküle und ermöglichten über die Signalmultiplizität eine zweifelsfreie Festlegung der Position der freien Hydroxylgruppe. Die Kombination der verschiedenen analytischen Methoden ergab, daß die *trans*-9-Methyl-10-octadecensäure an den ungewöhnlichen Lipidtyp Acylphosphatidylglycerin gebunden war. Die Reihe der homologen Verbindungen setzte sich folgendermaßen zusammen:

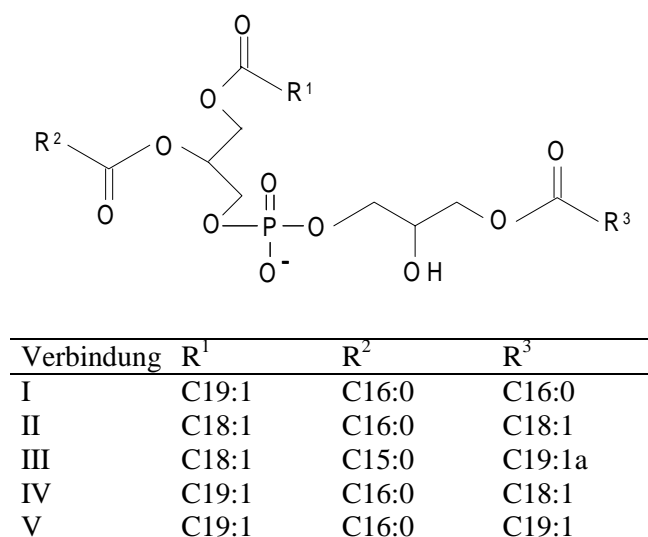


Abb. 3.31: Struktur der neuen Acylphosphatidylglycerine aus *Arthrobacter atrocyaneus*.

Im nächsten Schritt sollte die Bedeutung der neuen Fettsäure als Biomarker abgeschätzt werden. Hierfür wurde zusätzlich der Typstamm von *Corynebacterium variabilis* DSM 20132T und der zweite beschriebene Stamm *Corynebacterium variabilis* DSM 20536

bezüglich ihrer intakten Lipid- und Fettsäurezusammensetzung analysiert. In allen drei Stämmen wurde die *trans*-9-Methyl-10-octadecensäure detektiert, weshalb sie als potentieller Biomarker für diese Spezies anzusehen ist. Erwartungsgemäß waren die relativen Anteile der Fettsäuren und der Phospholipide in den Stämmen LMG 3820 und *Corynebacterium variabilis* DSM 20132T gleich. Überraschend waren hingegen die quantitativen Verhältnisse in *Corynebacterium variabilis* DSM 20536, die deutlich von den beiden erstgenannten Stämmen abwichen, obwohl alle drei Stämme eine identische 16S rDNA-Sequenz sowie DSM 20132T und DSM 20536 eine DNA-DNA-Homologie von 90.5% aufwiesen. Es konnte somit ganz klar gezeigt werden, daß deutliche Lipid- und Fettsäurevariationen auf Artebene zu beobachten sind.

3.16 Entwicklung von Oligonukleotid-Sonden

Aus zwei Hauptgründen ist die 16S rRNA als Zielmolekül für Oligonukleotide besonders gut geeignet. Zum einen erlaubt die Auswahl geeigneter Zielregionen ein Spezifitätsspektrum der Oligonukleotide, welches von den Domänen (Amann et al., 1990a; Stahl et al., 1991) über solche mit hohem phylogenetischen Niveau (Manz et al., 1992; Burggraf et al., 1994; Roller et al., 1994) bis hin zur Gattungs-, Art- oder Unterartebene reicht (Amann et al., 1990b; Ehrmann et al., 1992). Ein anderer wichtiger Aspekt ist die stetig wachsende Datenbank an 16S rRNA/rDNA-Sequenzen und deren allgemeine Zugänglichkeit.

Der erste Schritt bei der Konstruktion der Oligonukleotide war daher die in allgemein zugänglichen Datenbanken (RDP, FASTA) hinterlegten Sequenzen coryneformer Bakterien, phylogenetisch verwandter Spezies sowie die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Umweltisolate in den Olsen-Sequenzeditor einzulesen und dort manuell zu *alignen*. Bei diesem sogenannten *Alignment* werden rRNA-Sequenzen so angeordnet, daß homologe Sequenzabschnitte in Spalten untereinander stehen und so miteinander verglichen werden können. Eine solche Konstellation ermöglicht die Identifizierung von auffälligen Sequenzmerkmalen, die sich als Zielregionen für Sonden eignen, da sie spezifisch der gewünschten phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden können. Zusätzlich wurden die Datenbanken der TU München um die neu bestimmten oder dort nicht enthaltenen Referenzsequenzen erweitert und die Suche nach geeigneten Regionen für gruppenspezifische Sonden mit Hilfe der „probe design“ Funktion im Programmpaket ARB (Strunk und Ludwig, 1997) durchgeführt. Zur Beurteilung der Güte der auf diese Weise ausgearbeiteten Sondenvorschläge wurden diese sowohl gegen alle in der Datenbank der TU München vorhandenen 16S und 23S rRNA Daten mittels der „probe match“ Funktion im Programm ARB verrechnet als auch mit dem „probe check“ Programm der RDP (Maidak et al., 1994) und dem FASTA-Server analysiert, um die Spezifität der Oligonukleotide abzuschätzen.

3.16.1 Permeabilisierung Gram-positiver Bakterien mit hohem GC-Gehalt (GPHGC)

Während die Fixierung mit einer 4%igen Formaldehydlösung für die Stabilisierung und Permeabilisierung bei Gram-negativen Bakterien in der Regel ausreicht (Amann et al., 1995b), bleibt die Detektion einiger Vertreter der Gram-positiven Gruppen problematisch. Die hydrophoben Zellwände dieser Bakterien sind schwer zu permeabilisieren, so daß die Zielsequenzen ohne vorherige Behandlung der Zellen für Sonden unzugänglich bleiben. In der Vergangenheit wurden daher verschiedene Methoden entwickelt (De Los Reyes et al., 1997; Hönerlage et al., 1995; Mcnaughton et al., 1994), die zu einer Verbesserung der Zugänglichkeit für Oligonukleotide auch bei Anwesenheit von Mycolsäuren führten. Es gibt bis heute keine Methode, die standardmäßig für Gram-positive Bakterien eingesetzt werden kann.

Für die getesteten Stämme der coryneformen Bakterien sowie aller anderen Referenzstämmen erwies sich eine 10 minütige Behandlung mit einer 0.1 %igen Lysozymlösung als optimal. Auf diese Weise wurden hohe Signalintensitäten erzielt, morphologische Veränderungen wurden dabei nicht beobachtet.

3.16.2 Die Sonde MIB 756: Spezifisch für die Gattung *Microbacterium* sensu lato

Die Sonde MIB 756 ist spezifisch für die Gattung *Microbacterium*. Sie detektiert somit nicht nur die bisher gültig beschriebenen Arten der Microbakterien, sondern auch die in der vorliegenden Arbeit als Angehörige dieser Gattung identifizierten Stämme LMG 17247, LMG 17248, LMG 17258, LMG 17260, LMG 17270, LMG 17271, LMG 17418, LMG 17420, LMG 17421, LMG 17427, 24D-01, Bip-010b, Nap-23, Nap-57.

Die Zielregion der Sonde ist in einem variablen Bereich des 16S rDNA Moleküls lokalisiert (*E. coli* Numerierung: 756-773), in dem die *Microbacterium*-Referenzsequenzen im Vergleich zu allen anderen Sequenzen gattungsspezifische Unterschiede aufweisen.

Bei allen bisher bekannten 16S rDNA-Sequenzen wurde innerhalb der Sondenzielregion mindestens ein *Mismatch* (Basenfehlpaarung) zur Sequenz der Oligonukleotidsonde festgestellt. Dabei war in den meisten Fällen an Position 770 Guanin durch Cytosin ersetzt. Durch den Einsatz einer um diese Bindungsstelle konkurrierenden Sonde (Kompetitor) und stringenten Hybridisierungs- bzw. Waschbedingungen (s. Tab. 3.53) wurde die Spezifität der Sonde MIB 756 optimiert.

Tab. 3.50: *Alignment* der 16S rDNA-Zielregion von MIB 756 für Vertreter der Zielorganismen sowie einiger Referenzen mit sehr ähnlichen Sequenzen.

| Organismen | Zielregion | | |
|---|---|----------------------------|---------|
| | ↓ 756 | (<i>E. coli</i> Position) | 773 ↓ |
| Zielsequenz der Sonde MIB 756 (5'-3') | C T G A G G A G C G A A A G <u>G</u> G T G | | |
| Zielsequenz der Kompetitor-Sonde MIB 756 (5'-3') | C T G A G G A G C G A A A G <u>C</u> G T G | | |
| <i>Mi. liquefaciens</i> LMG 16342 ^T | | | |
| <i>Mi. esteraromaticum</i> LMG 4020 ^T | | | |
| <i>Mi. schleiferi</i> LMG 16153 ^T | | | |
| <i>Mycobacterium obuense</i> DSM 44075 ^T | | | C . . . |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> DSM 40697 ^T | | | C . . . |
| <i>Streptomyces albus</i> DSM 40763 ^T | | | C . . . |
| <i>Rhodococcus rhodochrous</i> DSM 443241 ^T | | | C . . . |
| <i>Nocardioides simplex</i> LMG 16261 ^T | | | T . . . |
| <i>Aeromicrobium fastidiosum</i> LMG 16205 ^T | | | C . . . |
| <i>Agromyces ramosus</i> DSM 43045 ^T | | | C . . . |
| <i>Curtobacterium luteum</i> LMG 8787 ^T | | | C . . . |

3.16.3 Die Sonde CEL 1030: Spezifisch für die Gattungen *Cellulomonas* und *Promicromonospora*

Die Sonde CEL 1030 erfasst eine große Anzahl der Arten der Gattung *Cellulomonas*, die in dieser Arbeit analysierten Umweltisolate LMG 17275 und LMG 17278 sowie die Gattung *Promicromonospora*. Die Zielregion der Sonde ist in einem hypervariablen Bereich des 16S rDNA Moleküls lokalisiert (*E. coli* Numerierung: 1030-1050); die Spezifität wurde durch den Einsatz zweier Kompetitoren gewährleistet. Die Arten *Ce. cellulans* und *Ce. fermentans* konnten mit dieser Sonde nicht detektiert werden, da die Sequenzunterschiede in dem betreffenden Abschnitt der 16S rDNA zu groß waren. Die Entwicklung einer Sonde zur Erfassung aller *Cellulomonas*-Stämme war nicht möglich, da die Sequenzen innerhalb der Gattung an den geeigneten Regionen zu stark differierten.

Tab. 3.51: *Alignment* der 16S rDNA-Zielregion von CEL 1030 für Vertreter der Zielorganismen sowie einigen Referenzen mit sehr ähnlichen Sequenzen.

| Organismen | Zielregion | | |
|---|---|----------------------------|--------|
| | ↓ 1030 | (<i>E. coli</i> Position) | 1050 ↓ |
| Zielsequenz der Sonde CEL 1030 (5'-3') | T A A G G T C G G T <u>G</u> T A C A G G T G | | |
| Zielsequenz der Kompetitor-Sonde NCEL 1030a (5'-3') | T A A G G T C G G T <u>A</u> T A C A G G T G | | |
| Zielsequenz der Kompetitor-Sonde NCEL 1030b (5'-3') | T <u>G</u> T G G T C G G T G T A C A G G T G | | |
| <i>Ce. flavigena</i> LMG 16263 ^T | C | | |
| <i>Ce. biazotea</i> LMG 16695 ^T | | | |
| <i>Ce. uda</i> LMG 16327 ^T | | | |
| <i>Ce. turbata</i> LMG 4072 ^T | C | | |
| <i>Ce. cellulans</i> DSM 43879 ^T | . G G ACA C T C . . . C | | |
| <i>Clavibacter michigan. subsp michigan.</i> DSM 46364 ^T | C A | | |
| <i>Streptomyces ambofaciens</i> DSM 40697 ^T | . G T | | |
| <i>Streptomyces albus</i> DSM 40763 ^T | . G T | | |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43066 ^T | . G T | | |
| <i>Janibacter limosus</i> DSM 11140 ^T | . T | | |
| <i>Propionibacterium lymphophilum</i> DSM 4903 ^T | A | | |

3.16.4 Die Sonde TER 821: Spezifisch für die Gattungen *Terrabacter* und *Janibacter*

Mit Hilfe der Sonde TER 821 können die Gattungen *Terrabacter* und *Janibacter* sowie das Umweltisolat LMG 17273 spezifisch *in situ* nachgewiesen werden. Die Zielregion der Sonde ist in einem variablen Bereich des 16S rDNA-Gens lokalisiert (*E. coli* Numerierung: 821-840).

Tab. 3.52: *Alignment* der 16S rDNA-Zielregion von TER 821 für Vertreter der Zielorganismen sowie einigen Referenzen mit sehr ähnlichen Sequenzen.

| Organismen | Zielregion | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|
| | ↓ 821 | (E. coli Position) | | | | | | | | | | | | | | 840 ↓ |
| Zielsequenz der Sonde TER 821 (5'-3') | G | G | A | A | C | T | A | G | G | T | G | T | G | G | T | C T C A |
| <i>Terrabacter tumescens</i> LMG 3818 ^T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| Umweltisolat LMG 17273 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| „ <i>Arthrobacter duodecadis</i> “ LMG 16469 ^T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Janibacter limsows</i> DSM 11140 ^T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Propionibacterium cyclohexanicum</i> NRIC 0247 | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Cellulomonas turbata</i> LMG 4072 ^T | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . |
| „ <i>Arthrobacter duodecadis</i> “ LMG 16469 ^T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Gordona sputi</i> DSM 43896 ^T | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . |
| <i>Gordona bronchialis</i> DSM 43247 ^T | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . |
| <i>Mycobacterium obuense</i> DSM 44075 ^T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | C |
| <i>Promicromonaspora enterophila</i> DSM 43852 ^T | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . |

3.16.5 Einstellung der optimalen Hybridisierungsbedingungen

Zur Optimierung der Sondenspezifität wurden neben den Zielorganismen Bakterienstämme herausgesucht, die eine oder mehrere ausgetauschte Basen (Fehlpaarungen) in der Zielsequenz aufwiesen. Durch stufenweise Erhöhung der Formamidkonzentration (10-50%) im Hybridisierungspuffer wurden die Bedingungen eingestellt, bei der die gebildeten Hybride noch stabil waren und die Sonden die höchste Spezifität aufwiesen. Auf ein Austesten der Sonden, die nicht für einen *in situ* Einsatz geeignet waren, wurde verzichtet.

Tab. 3.53: Hybridisierungs- und Waschbedingungen für die entwickelten Sonden

| Sonde | Hybridisierung | | Waschen | |
|----------|----------------|------------|---------|------------|
| | Formamid | Temperatur | NaCl | Temperatur |
| MIB 756 | 45% | 46°C | 56 mM | 48°C |
| CEL 1030 | 45% | 46°C | 56 mM | 48°C |
| TER 821 | 35% | 46°C | 80 mM | 48°C |

Teil II

Charakterisierung der Struktur natürlicher Biofilme aus einem PCB-belasteten Standort mit Hilfe fluoreszenzmarkierter phylogenetischer Sonden unter Einsatz der konfokalen Lasermikroskopie

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Biofilme aus einem PCB-belasteten Standort untersucht, um die folgenden Fragestellungen zu klären:

1. Unterscheiden sich Biofilme aus unterschiedlich stark PCB-belasteten Bodenproben in ihrer Struktur voneinander?
2. Sind coryneforme Bakterien in den belasteten Bodenproben abundant?
3. In welchen Assoziationen liegen sie vor?
4. Ist ihre Abundanz abhängig vom Belastungsgrad des Habitats?

Zur Charakterisierung der Biofilme wurde die konfokale Lasermikroskopie in Verbindung mit der Methode der *in situ* Hybridisierung angewendet. Diese Experimente wurden im Rahmen eines DAAD-Kurzzeitstipendiums an der University of Saskatchewan in Saskatoon, Kanada, in der Arbeitsgruppe von Dr. D. E. Caldwell durchgeführt.

3.17 Standort und Versuchsablauf

Die PCB-kontaminierten Bodenproben stammten von einer Deponie eines ehemaligen Raketenstützpunkt der Westgruppe der sowjetischen Armee in der Nähe der Stadt Wittenberg in Sachsen-Anhalt. Es wurden dort an drei verschiedenen Stellen Proben genommen, die sich durch unterschiedliche Belastungsgrade auszeichneten. Die in Zusammenarbeit mit Peter Wolff (GBF, AG Chemische Mikrobiologie) bestimmten PCB-Konzentrationen ergaben, daß eine Probenahmestelle mit 3 mg kg^{-1} nur sehr schwach kontaminiert (SK) war, die zweite Probenahmestelle mit 100 mg kg^{-1} einen mittleren Belastungsgrad (MK) darstellte und die dritte Stelle mit 1000 mg kg^{-1} eine sehr hohe Kontamination (HK) aufwies. Diese drei Böden wurden als Inoculum verwendet. Es wurden sechs verschiedene Versuchsansätze aufgebaut, bei denen durch die drei verschieden stark PCB-kontaminierten Böden jeweils ein kontinuierlicher Fluß eines Minimalmediums ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle (SK1, MK1, HK1) sowie eines Minimalmedium mit 50 mg l^{-1} Glucose (SK2, MK2, HK2) geleitet wurde. Hierdurch sollte der in der Natur ablaufende Regenprozeß simuliert werden. Die Entwicklung der Biofilme wurde unter Verwendung von Mehrkanaldurchflußzellen (Wolfaardt et al., 1994; Korber et al., 1997) verfolgt. Diese Durchflußzellen hatten sich in dem kanadischen Team zuvor schon bei verschiedenen Untersuchungen wie der Analyse grundsätzlicher mikrobieller Verhaltensweisen (Caldwell und Lawrence, 1986), bakterieller Bindungsprozesse (Korber et al., 1990), Biofilmentwicklungskinetiken (Korber et al., 1989; Caldwell und Lawrence, 1986), antibakterieller Wirksamkeiten (Korber et al., 1994, 1997) und schadstoffabbauender

mikrobieller Gemeinschaften (Wolfaardt et al., 1994, 1998; Møller et al., 1997) bewährt. Die Mehrkanaldurchflußzellen hatten die Vorteile, zum einen die Replikation und Kontrolle des Experiments zu vereinfachen und zum anderen unterschiedliche Behandlungsarten der einzelnen Kanäle zu ermöglichen. Die Zellen wurden so konstruiert, daß sie direkt auf dem Mikroskoptisch befestigt werden konnten. Auf diese Weise konnte das Beobachtungsfeld erschütterungsfrei parallel zum Tisch verschoben bzw. mit der unterstützenden Software dasselbe Feld zu verschiedenen Zeiten angesteuert werden.

Im nächsten Schritt sollte die Artenzusammensetzung mit verschiedenen großgruppenspezifischen phylogenetischen Sonden untersucht werden, um dann den Schwerpunkt auf die coryneformen Bakterien zu legen. Dieser Versuchsabschnitt sollte durch den kombinierten Einsatz von *in situ* Hybridisierung und konfokaler Lasermikroskopie bearbeitet werden. Die Verbindung der beiden Methoden bietet den Vorteil, daß die Biofilme zerstörungsfrei oder zumindest zerstörungsarm analysiert werden können und Informationen über die dreidimensionale Anordnung der Bakterien erhalten bleiben. Somit sind detaillierte Aussagen über die Organisation, Kommunikation und Wechselwirkung der Organismen möglich. Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse vergleichen die Entwicklung der Biofilme aus verschiedenen stark PCB-kontaminierten Böden und zeigen die Möglichkeiten und Schwierigkeiten der *in situ* Hybridisierung in Durchflußzellen auf.

3.18 Entwicklung und Struktur mikrobieller Biofilme aus unterschiedlich stark PCB-belasteten Bodenproben

Die optische Sektionierung mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie zeigte (Abb. 3.32), daß keine auffälligen Unterschiede zwischen den Biofilmen, die ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle und denjenigen, die 50 mg l⁻¹ Hefeextrakt zur Verfügung gestellt bekommen hatten, zu beobachten waren. Die Biofilmentwicklung folgte in beiden Fällen dem gleichen für den Belastungsgrad des Bodens typischen Muster. In den ersten Tagen war eine geringe Besiedelung der Glasoberfläche festzustellen. Bei den Bodenproben mit einer PCB-Konzentration von 3 mg kg⁻¹ Boden waren die meisten Zellen zunächst in Clustern konzentriert. Die weitere Entwicklung war sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Richtung durch ein von diesen Zellansammlungen ausgehendes Wachstum geprägt. Die Biofilmorganisation blieb in den meisten Fällen nach 11 Tagen stabil. Deutliche Unterschiede waren in Abhängigkeit von der PCB-Konzentration im Inoculum zu beobachten. Die Zellen der Bodenproben mittleren Kontaminationsgrades waren gleichmäßig über den Biofilm verteilt und zeigten nicht die gleich hohe Neigung zu Aggregationen. Bei diesen Biofilmen entwickelten sich sehr viel schneller konfluente Zellschichten (in weniger als drei Tagen), und sie erreichten schon nach 7 Tagen eine stabile Architektur.

Bei den Proben mit dem höchsten Belastungsgrad an PCBs wurde hingegen wieder, wie schon bei den Biofilmen der Kontrollböden, die Ausbildung von Zellhaufen beobachtet.

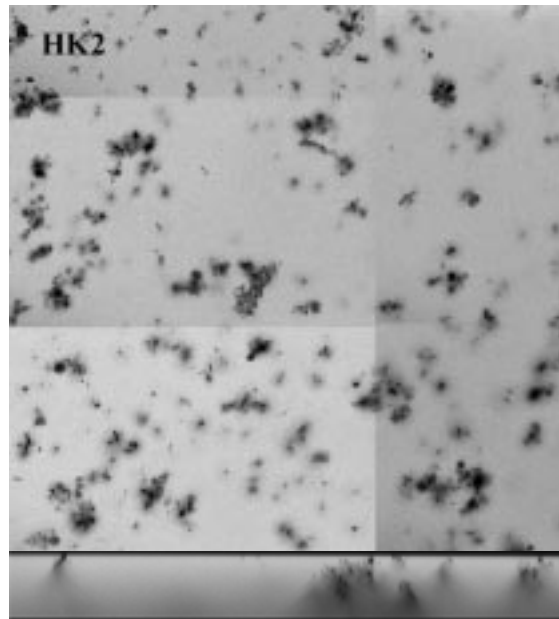
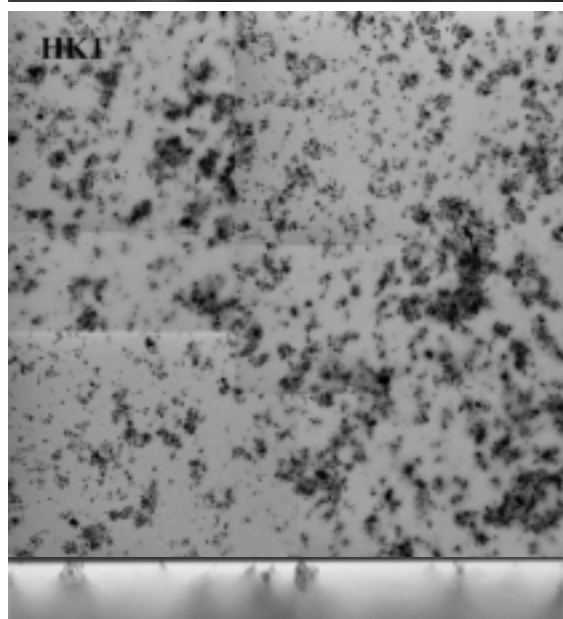
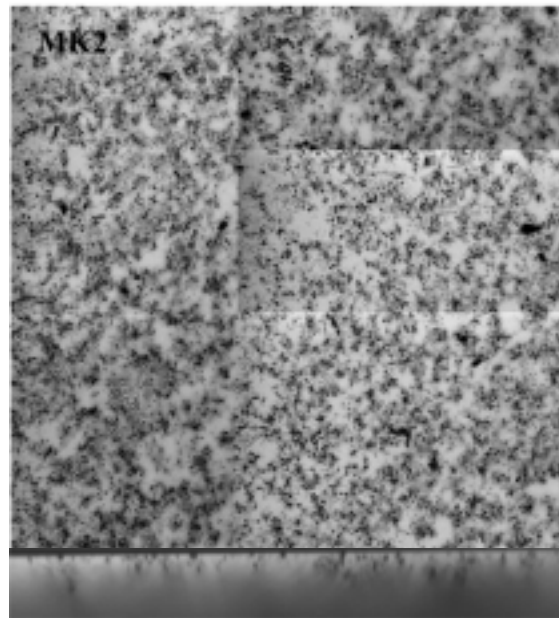
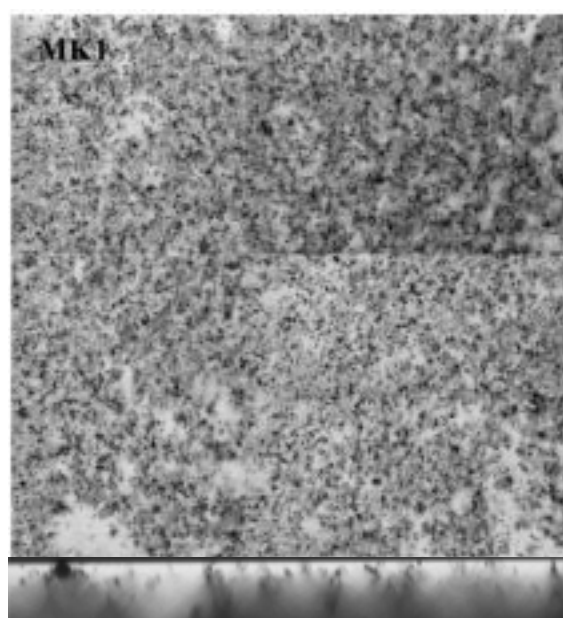
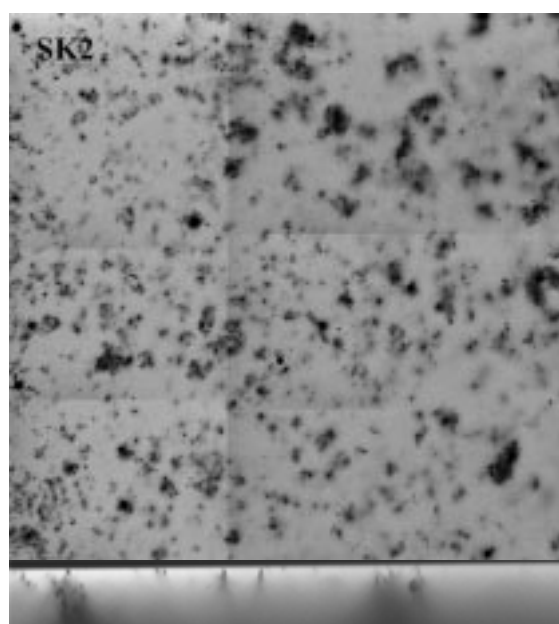
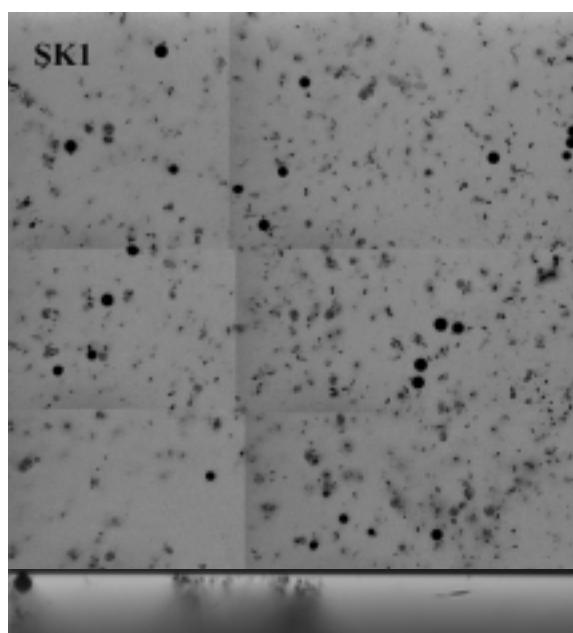


Abb. 3.32: Horizontale (xy) und vertikale (xz) Schichtaufnahmen von Fluorescein-gefärbten Biofilmen, die aus unterschiedlich stark PCB-kontaminierten Böden (SK=3 mg PCB kg⁻¹ Boden, MK=100 mg kg⁻¹, HK=1000 mg kg⁻¹) über einen Zeitraum von 5 d in Durchflußzellen aufwuchsen. Den mit der Ziffer 1 bezeichneten Biofilmen standen nur die im Inoculum enthalten Kohlenstoffquellen zur Verfügung, wohingegen bei den mit der Ziffer 2 gekennzeichneten Biofilmen zusätzlich 50 mg l⁻¹ Hefeextrakt im Medium enthalten war. Alle xy-Aufnahmen entstanden bei einer Tiefe von 0 µm und wurden zur Darstellung einer größeren Fläche des Biofilms digital zusammengesetzt. In den xz-Präsentationen ist über den Zellen das Deckgläschen zu sehen, dann folgt der Biofilm, und der unterste Bereich stellt die Biofilm-Flüssigkeit-Grenzfläche dar.

3.18.1 Zelldichte und Biofilmtiefe

Die durchschnittlich besiedelte Fläche in der Biofilmschicht direkt unter der Glasoberfläche variierte in Abhängigkeit vom PCB-Belastungsgrad der jeweiligen Bodenprobe recht stark (Abb. 3.34). Die stärkste Besiedelung war bei den Proben MK an allen Meßtagen zu beobachten. Kein einheitlicher Trend ließ sich beim Wachstum mit oder ohne Kohlenstoffquelle im kontinuierlich durch das Inoculum geleiteten Minimalmedium beobachten. Bereits nach 5 Tagen war praktisch bei allen Durchflußzellen die maximale Besiedlungsdichte an der Glasoberfläche erreicht. Die weiteren Veränderungen fanden in den nächsten Schichten statt.

Auch die Biofilmtiefen (Abb. 3.35) schwankten aufgrund der Ausbildung von Zellhügeln sehr stark, was die hohen Standardabweichungen erklärt. Nach 11 Tagen hatten die Biofilme aller sechs Versuchsansätze eine nahezu einheitliche Tiefe erreicht. Das vertikale Wachstum war zu diesem Zeitpunkt fast vollständig abgeschlossen, obwohl die Biofilmtiefe mit ca. 5 µm noch vergleichsweise gering war.

3.18.2 Zellgröße und Morphologie

Die Zellen der Bodenprobe SK waren etwas größer als diejenigen der Proben MK und HK. Zwischen den Biofilmen mit und ohne Hefeextrakt wurden keine Unterschiede festgestellt. Vor allem in den Biofilmen der Proben MK und HK wurden Zellen verschiedener Morphologie beobachtet. Besonders auffällig waren kleine kokkoide Zellen, die sich zu Clustern zusammenschlossen.

In allen Versuchsansätzen waren Protozoen vorhanden; vermehrt traten diese jedoch in den Proben SK1 und SK2 auf.

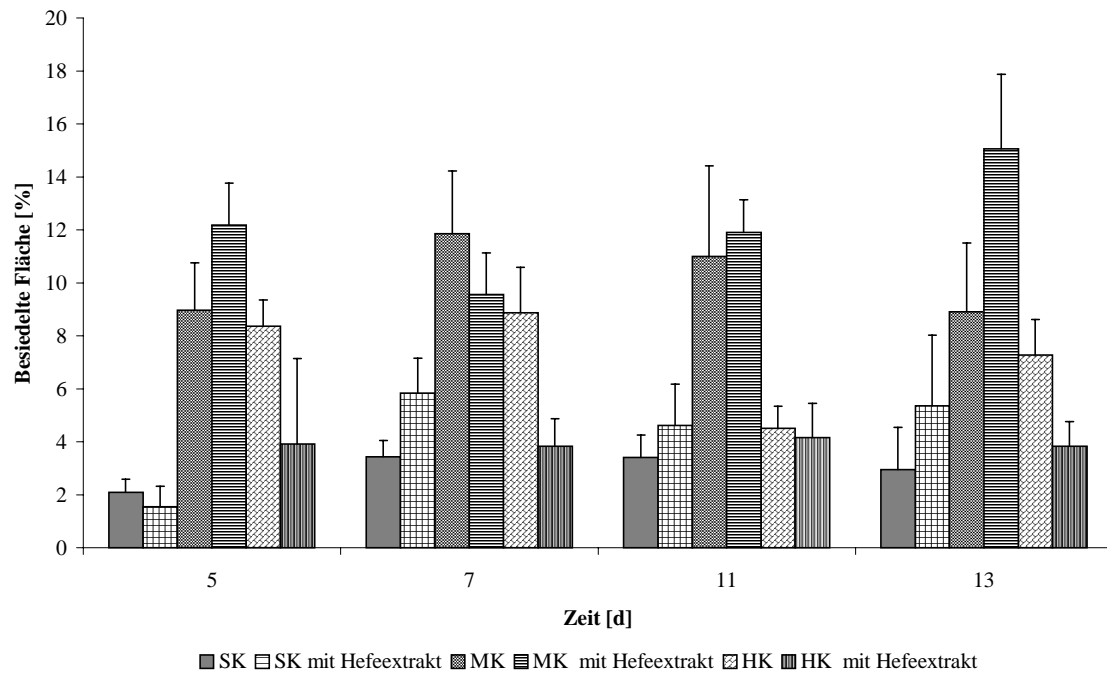


Abb. 3.34: Darstellung der von Bakterien besiedelten Fläche bei einer Tiefe von 0 µm zu verschiedenen Zeitpunkten der Biofilmentwicklung.

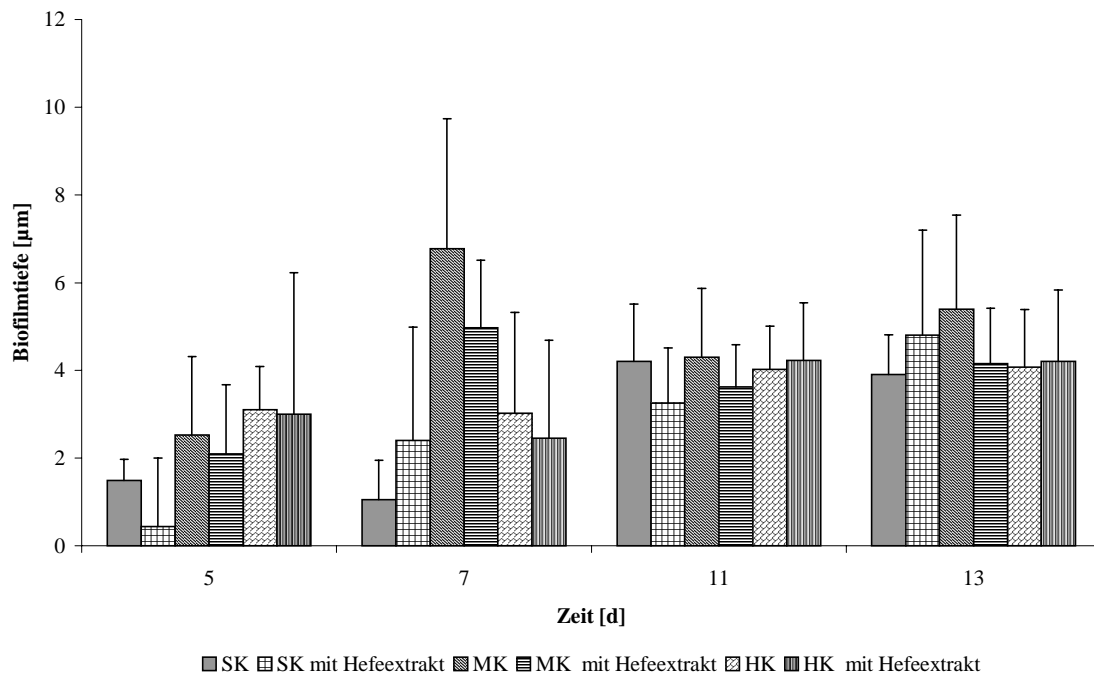


Abb. 3.35: Graphische Darstellung der Biofilmtiefe zu verschiedenen Versuchszeitpunkten.

3.19 Analyse der bakteriellen Zusammensetzung von Biofilmen mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung

Ziel dieses Experimentes war es, eine direkte Analyse der bakteriellen Zusammensetzung und Verteilung von Biofilmen in Durchflußzellen unter Verwendung von rRNA-Sonden und der konfokalen Lasermikroskopie zu entwickeln. Als Grundlage diente die von Amann und Mitarbeitern 1995 beschriebene Methode der *in situ* Hybridisierung von Einzelzellen. Es wurden zunächst die wichtigsten Parameter dieser Methode an Modellbiofilmen optimiert.

3.19.1 Optimierung der *in situ* Hybridisierung an Modellbiofilmen in Durchflußzellen

Durchflußzellen

Für eine direkte Analyse der bakteriellen Gemeinschaft in den Durchflußzellen waren die zuvor verwendeten Modelle nicht geeignet, da das Volumen der einzelnen Kanäle eine zu große Menge der fluoreszenzmarkierten Sonde vorausgesetzt und somit einen nicht vertretbaren Kostenaufwand bedeutet hätte. Es wurden daher Zellen mit sehr kleinen Abmessungen (0.5 x 1 x 10 mm) der Kanäle konstruiert.

Fixierung und Permeabilisierung der Biofilme

Bei den heute routinemäßig eingesetzten Verfahren zur *in situ* Hybridisierung werden die Zellen zunächst mit einer 4%igen Formaldehydlösung (Amann et al, 1995b) oder einer 1:1-Mischung aus Ethanol und PBS (Roller et al., 1994) über mehrere Stunden fixiert und dann einer fallenden Ethanolreihe (50, 80 und 96%) unterzogen. Diese Schritte sollen sowohl der Fixierung als auch der Permeabilisierung der Zellen dienen. In verschiedenen Ansätzen wurde diese Methode verkürzt, um den Biofilm so wenig Behandlungen wie möglich auszusetzen. Letztendlich wurde der Biofilm nur noch 3 min mit einer 96%igen Ethanolösung inkubiert. In allen Versuchen schienen keine Veränderungen der Hybridisierungseffizienz beobachtbar zu sein. Für eine endgültige Beurteilung der Notwendigkeit der einzelnen Schritte hätte jedoch eine genaue Quantifizierung der Zellen erfolgen müssen. Dies war nicht der Fall.

Sondenkonzentration

Die Sondenkonzentration wurde stufenweise von 500-5000 ng für FITC und 200-2000 ng für Cy3-markierte Sonden je 100 µl Ansatz erhöht. Die Ergebnisse zeigten, daß bei eingesetzten Mengen von 2000 ng für FITC und 1000 ng für Cy3-markierte Sonden zufriedenstellende Signalintensitäten erzielt werden konnten.

Hybridisierungsdauer

Die Hybridisierungsdauer wurde von 1.5 h in Intervallen von 30 min auf 4 h ausgedehnt, um die Dauer zu bestimmen, bei der die höchsten Signaleffizienzen erreicht werden konnten. Dabei stellte sich eine Hybridisierungsdauer von 3 h unter Berücksichtigung der Faktoren Effizienz und Zeitaufwand als optimal heraus.

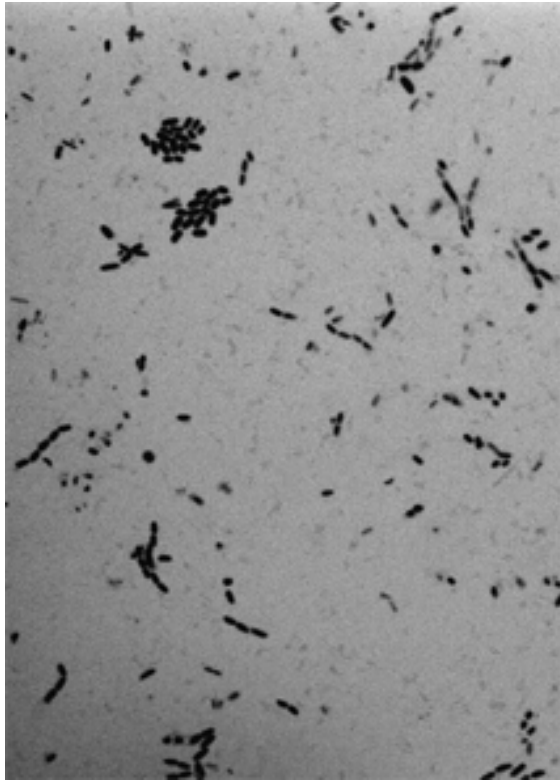
Ausbleichungseffekte

Bei der Analyse der Hybridisierungsergebnisse war ein rasantes Ausbleichen der Signale insbesondere bei FITC-markierten Sonden zu beobachten. Diese Abschwächung war im stärkeren Maße bei der Auswertung mit dem konfokalen Lasermikroskop, aber auch am Lichtmikroskop festzustellen. Daher wurden die Kanäle nachfolgend nach Abschluß der Hybridisierungen mit einer Lösung gefüllt (2x SlowFade, Molecular Probes, Eugene, Oreg.), die eine Verringerung der Signalintensität verhindern bzw. verlangsamen sollte; diese Beobachtung konnte jedoch nicht bestätigt werden. Aufgrund der hohen Viskosität dieser Lösung waren zudem Veränderungen des Biofilms festzustellen, weshalb von einer weiteren Anwendung abgesehen wurde. Im folgenden wurden deshalb sowohl die Schritte Fixierung, Permeabilisierung und Hybridisierung als auch die mikroskopische Untersuchung der Biofilme an einem Tag durchgeführt.

3.19.2 Auswirkungen der *in situ* Hybridisierung auf die Struktur der Biofilme

Befürchtungen, daß die verschiedenen Behandlungsschritte während der Hybridisierung Veränderungen der Biofilmstruktur hervorrufen würden, wurden nicht bestätigt. Abb. 3.36 zeigt eindeutig, daß keine Veränderungen in der Zusammensetzung und des Aufbaus des Biofilms durch den gesamten Prozeß verursacht wurden. Auch die Biofilmtiefe blieb unverändert. Die Ergebnisse machen deutlich, daß eine zusätzliche Stabilisierung durch Polyacrylamid (Møller et al., 1998) oder andere Materialien nicht notwendig ist.

A



B

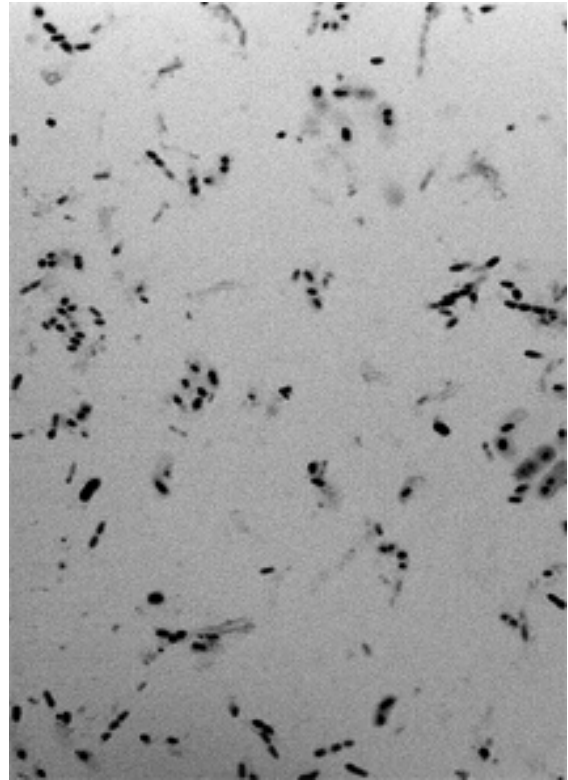


Abb. 3.36: Aufnahmen zufällig ausgewählter Biofilmausschnitte vor (A) und nach (B) Fixierung, Permeabilisierung und Hybridisierung.

3.19.3 *In situ* Hybridisierung eines natürlichen Biofilms in Durchflußzellen

Bei Übertragung der an Modellgemeinschaften entwickelten Methode zur *in situ* Hybridisierung in Durchflußzellen auf Biofilme aus PCB-belasteten Bodenproben konnten zunächst keine zufriedenstellenden Signalintensitäten erreicht werden. Die geringen Signalstärken gestalteten Aussagen über die Artenzusammensetzung oder gar räumliche Verteilung der Proben schwierig. Diese Probleme traten vorwiegend bei FITC-markierten Sonden auf; die Cy3-markierten Sonden zeigten ein ungleich stärkeres Signal selbst bei deutlich geringerer Konzentration. Mögliche Ursachen für diese schwachen Signalintensitäten, insbesondere der FITC-markierten Sonden, konnten eine zu geringe Sondenkonzentration, die Impermeabilisierung der Zellen (Boehnisch et al., 1989) oder ein nicht ausreichender Ribosomengehalt (Poulsen et al., 1993) derselben aufgrund herrschender Mangelbedingungen sein. Zur Optimierung der Methode für natürliche Biofilme wurden daher die nachfolgend beschriebenen Parameter variiert.

Sonden-Konzentration

Es wurden Sonden-Konzentrationen von 100 ng bis 10 µg je 100 µl-Reaktionsansatz bei der *in situ* Hybridisierung eingesetzt, um die Konzentration auszutesten, bei der optimale Signalintensitäten erzielt werden konnten. Doch auch die Erhöhung der Sondenkonzentration um zwei Zehnerpotenzen sorgte für keine Verbesserung der Signalstärken.

Ribosomengehalt

Da die Signalintensität proportional vom rRNA-Gehalt der Zelle abhängt (Bremer et al., 1987) und dieser wiederum mit der Aktivität der Zelle positiv korreliert ist (DeLong et al., 1989), wurde versucht, das Wachstum der Bakterien innerhalb des Biofilms einige Stunden vor der *in situ* Hybridisierung zu stimulieren. Die Durchflußzellen wurden von der Versuchsanordnung abgeklemmt und in einer Versuchsreihe mit 0.3 g l⁻¹ TSB, 1.5 g l⁻¹ TSB und 50 mg l⁻¹ Hefeextrakt im Minimalmedium über einen Zeitraum von 8 h versorgt.

TSB löste in beiden Konzentrationen eine auffällige Vergrößerung der Zellen und eine Veränderung der Architektur der Biofilme aus. Die Signalintensitäten blieben dabei gering. Dagegen führte der Zusatz von 50 mg l⁻¹ Hefeextrakt im Minimalmedium zu einer deutlichen Verstärkung der Signale. Die Struktur des Biofilms blieb dabei offensichtlich erhalten.

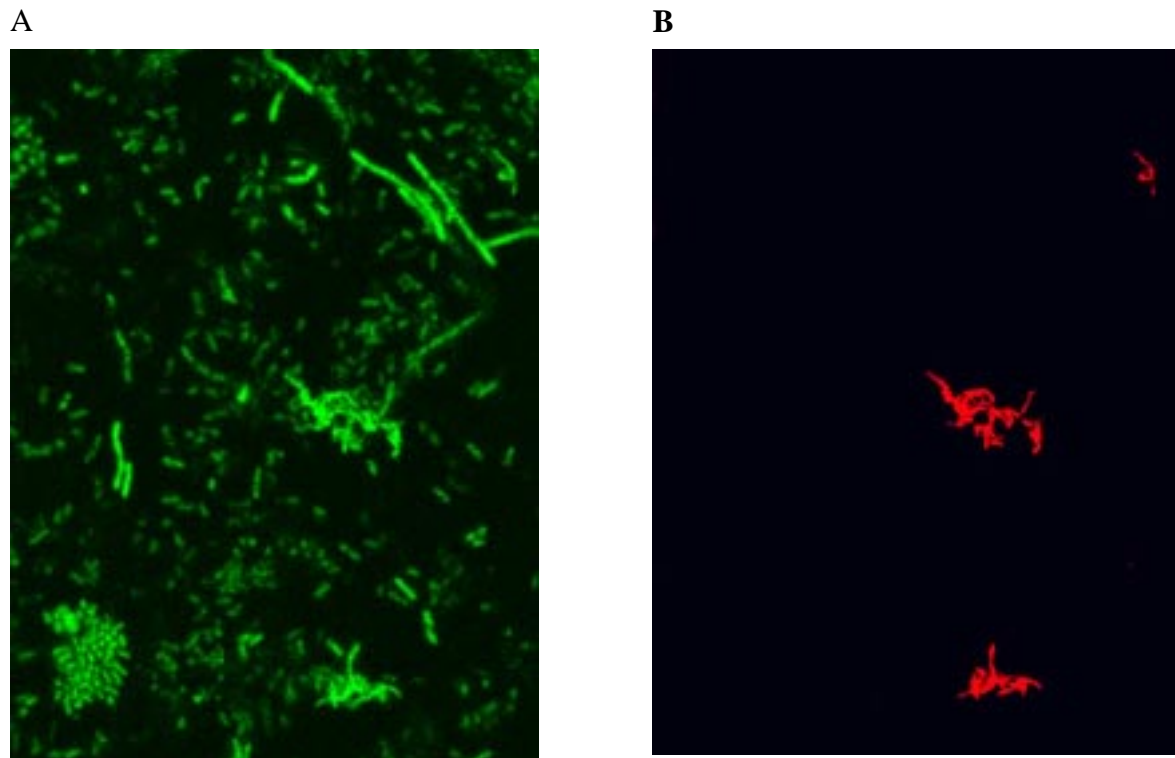


Abb. 3.37: Hybridisierung eines Biofilms aus einer PCB-belasteten Bodenprobe mit der FITC-markierten Sonde Eub338 (A) und der Cy3-markierten Sonde GPHGC (B) nach der Zugabe von 50 mg l⁻¹ Hefeextrakt im Minimalmedium über einen Zeitraum von 8 h.

Eine vollständige Analyse der Zusammensetzung und räumlichen Verteilung der bakteriellen Gemeinschaft von Biofilmen aus unterschiedlich stark belasteten Bodenproben durch Kombination von *in situ* Hybridisierung und konfokaler Lasermikroskopie konnte innerhalb des dreimonatigen Forschungsaufenthaltes aus Zeitgründen leider nicht mehr erfolgen.

4. Diskussion

Teil I

Vergleich chemotaxonomischer und phylogenetischer Methoden zur Charakterisierung coryneformer Bakterien

Coryneforme Bakterien sind aus mehreren Gründen von besonderem biotechnologischen Interesse. Sie zeichnen sich auf der einen Seite durch eine außerordentlich große Bandbreite physiologischer Aktivitäten aus. Hierbei ist u. a. die enantioselektive Hydrolyse von Aryl- und Alkylhydantoinderivaten (May et al., 1998) und Metabolisierung von Fluoren (Casellas et al., 1997) sowie Dimethylsulfon (Sabourin et al., 1996) zu nennen. Auf der anderen Seite verfügen sie als Vertreter der *Actinomycetales* über einen ausgeprägten Sekundärstoffwechsel. Daher gelten sie als eine vielversprechende Produzentengruppe bei der Suche nach neuen Enzymen und potentiellen Wirkstoffen. Einige Spezies der coryneformen Bakterien sind auch aufgrund ihrer tier-, human- oder phytopathogenen Eigenschaften von gewisser Bedeutung.

Die Differenzierung und Klassifizierung von coryneformen Bakterien konnte in den letzten Jahren durch die Ergebnisse zahlreicher numerisch phänotypischer (Kämpfer et al., 1993, Seiler, 1983) und chemotaxonomischer Studien erheblich verbessert werden. Wichtige Beiträge lieferten dabei die systematischen Analysen der polaren Lipide (Lechevalier 1977, 1981, 1982; Collins und Jones, 1980; Minnikin et al., 1978), der zellulären Fettsäuren (Minnikin et al., 1979; Henningson und Gudmestad, 1991; Collins et al., 1982; Bousfield et al., 1983; Kämpfer und Kroppenstedt, 1996), der Chinone (Collins et al., 1979), der Peptidoglycantypen und Diaminosäuren (Schleifer und Kandler, 1972) sowie der Polyamine (Altenburger et al., 1997). Phylogenetische Vergleiche von 16S rRNA/rDNA machten aber auch deutlich, daß eine zuverlässige Klassifizierung der coryneformen Bakterien nur durch die Kombination konventioneller Methoden (Chemotaxonomie, Physiologie, DNA-DNA Hybridisierung) mit modernen molekularbiologischen Methoden (16S rDNA-Sequenzierung) erzielt werden kann (Stackebrandt et al., 1980a; Suzuki et al., 1981; Park et al., 1987; Rainey et al., 1994; Takeuchi et al., 1994).

Trotz dieser genannten Fortschritte stehen derzeit jedoch immer noch keine schnellen und kostengünstigen Screening- und Identifizierungsstrategien für die coryneformen Bakterien zur Verfügung, die eine zuverlässige Klassifizierung bis auf Artebene erlauben. Deshalb war es die Zielsetzung dieser Arbeit, die Zusammensetzung der polaren Lipide und deren Fettsäuren als phänotypische Charakteristika mit den phylogenetischen Verwandtschaften, basierend auf 16S rRNA-Sequenzen, zu vergleichen. Als Ergebnis sollte eine Methode mit hohem Automatisierungsgrad hervorgehen, die eine sichere und hochauflösende Identifizierung auch großer Stammzahlen ermöglicht.

4.1. Polyphasische Identifizierung ausgewählter coryneformer Bakterien

4.1.1 FAME-Profile

Die GC-Analyse zellulärer Fettsäuren wurde 1963 von Abel und Mitarbeitern zur Klassifizierung von Bakterien eingeführt und hat sich seit dieser Zeit zu einem wichtigen Bestandteil der bakteriellen Systematik entwickelt. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, daß Lipide aus Zellmaterial allgemein leicht und quantitativ isoliert werden können (Ratledge und Wilkinson, 1988; Lechevalier, 1982; Janzten und Bryn, 1985; Kroppenstedt, 1985). Zusammen mit der unkomplizierten Präparation der Fettsäuren als FAME aus bakterieller Biomasse entwickelte sich ein attraktiver Identifizierungsansatz, der daher in der Vergangenheit eine breite Anwendung in den verschiedensten taxonomischen Studien (z. B. Übersichtsartikel Suzuki et al., 1993) fand. Technische Weiterentwicklungen der chromatographischen Systeme sowie der mittlerweile hohe Automatisierungsgrad der Auswertung förderten zusätzlich die Verbreitung dieser Methode. Im Zuge dieser Fortschritte wurde das Software-Paket MIS (Microbial ID Inc., Newark, DE, USA) entwickelt, mit dem nicht nur die Chromatogramme automatisch ausgewertet werden können, sondern eine direkte Identifizierung der Bakterien durch Vergleich mit den in der angeschlossenen Datenbank gespeicherten Fettsäureprofilen erfolgt. Die Grenzen der taxonomischen Auflösung sind hierbei in Abhängigkeit von der analysierten Bakteriengruppe zwischen der Gattungs- und Artebene anzusiedeln. Während dieser Ansatz die Analyse der Gesamtzellfettsäuren vorsieht, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob eine Steigerung des Auflösungsvermögens und der taxonomische Aussagekraft durch die Kombination der separat untersuchten Fettsäuren aus Phospho- und Glykolipiden möglich war. Daher wurde für die automatisierte Identifizierung ausgewählter Gattungen der coryneformen Bakterien erstmalig eine Datenbank aus den getrennt analysierten Fettsäureprofilen der Phospho- und Glykolipide aufgebaut.

Die Analyse der FAMEs legte die Einteilung der coryneformen Gattungen in zwei Hauptgruppen nahe. Eine Gruppe war durch hohe Anteile an iso- und anteiso-verzweigten Fettsäuren, die andere durch einen hohen Gehalt an unverzweigten sowie in einigen Fällen dem Auftreten von 10-Methyl-verzweigten Fettsäuren gekennzeichnet.

Gruppe I:

Gruppe I umfaßte verschiedene Cluster der Gattungen *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Agromyces*, *Cellulomonas* und *Curtobacterium*.

Ein Vergleich der Fettsäurezusammensetzungen der Phospho- und Glykolipidfraktionen dieser Gattungen zeigte zum einen, daß sie hohe Anteile von 15:0a und 17:0a als gemeinsames Kriterium aufwiesen. Der Vergleich verdeutlichte zum anderen aber auch, daß keine diagnostischen Fettsäuren oder Fettsäurekombinationen für die verschiedenen

phylogenetischen Gruppen existierten. Die Gruppierungen innerhalb der Gruppe I basierten daher vor allem auf quantitativen Unterschieden.

Die Stämme der Gattung *Arthrobacter* bildeten innerhalb der Gruppe I drei Gruppierungen (s. Abb. 3.13 und 3.15). Alle Vertreter waren durch hohe Anteile der Fettsäuren 15:0a und 17:0a gekennzeichnet, wobei 15:0a in den überwiegenden Fällen die Hauptkomponente darstellte. Die vergleichsweise geringen Anteile an 17:0a lieferten einen Hinweis zur Unterscheidung der Arthrobakterien von den Gattungen *Microbacterium*, *Agromyces* und *Curtobacterium*. Im Gegensatz zu den anderen Gattungen enthielten die *Arthrobacter*-Stämme zusätzlich die Fettsäure 15:0i in signifikanten Mengen. Die klassische Aufteilung der Gattung *Arthrobacter* in die *Ar. globiformis*/*Ar. citreus* und die *Ar. sulfureus*-Gruppe, die auf unterschiedlichen Peptidoglycanvarianten basiert, konnte bei den Fettsäuren nicht beobachtet werden. Dies steht im Einklang zu früheren Untersuchungen (Keddie et al., 1986).

Im Fall der Gattung *Microbacterium* wurde eine Aufteilung in zwei Gruppierungen beobachtet. Ein gemeinsames Cluster bildeten die Typstämme von *Mi. esteraromaticum*, *Mi. keratanolyticum*, *Mi. arabinogalactanolyticum* und *Mi. flavescens* mit den verschiedenen Stämmen der Gattung *Agromyces*, während die Arten *Mi. trichothecenolyticum*, *Mi. schleiferi*, *Mi. liquefaciens*, *Mi. testaceum* und *Mi. barkeri* in ihrer Fettsäurezusammensetzung eine große Ähnlichkeit zur Gattung *Curtobacterium* zeigten. Insgesamt wurden durch diese Ergebnisse die ausgeprägten phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen coryneformen Bakterien vom Peptidoglycantyp der Gruppe B bestätigt, die schon in vorangegangenen numerischen taxonomischen und phylogenetischen Studien offensichtlich geworden waren (Döpfer et al., 1982; Rainey et al., 1994; Kämpfer et al., 1993, 1996).

Mit Ausnahme der beiden Typstämme von *Ce. turbata* und *Ce. cellulasea* zeigte die Gattung *Cellulomonas* eine sehr einheitliche Fettsäurezusammensetzung. Wie bei den Arthrobakterien stellte die Fettsäure 15:0a die Hauptfraktion dar. Die *Cellulomonas*-Stämme konnten jedoch deutlich von Vertretern dieser Gattung durch die prägnanten Mengen der Fettsäure 16:0a und die auffallend niedrigen Anteile an iso-verzweigten Fettsäuren unterschieden werden. In einigen Stämmen wurden ungewöhnlich hohe Anteile der Fettsäure 14:0 detektiert, was die Beobachtungen von Kämpfer et al. (1996) bestätigte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die Gattungen der coryneformen Bakterien der Gruppe I durch eine geringe Diversität von Fettsäuren gekennzeichnet war. Die fehlende Vielfalt zwischen den einzelnen Taxa erschwerte die Analyse intragattungsspezifischer Verhältnisse (Vancanneyt et al., 1996).

Gruppe II:

Die Untergruppen der Gruppe II wurden im Gegensatz zur Gruppe I von einzelnen Taxa gebildet.

Eine Gruppierung innerhalb der Gruppe II bildeten die analysierten Stämme der Gattung *Nocardioides*. Die Spezies zeichneten sich durch ein komplexes Fettsäureprofil mit 16:0i als dominierende Komponente aus. Weiterhin wurden größere Mengen unverzweigter, gesättigter

Fettsäuren sowie der Tuberculostearinsäure (TBSA) detektiert. Diese Kombination wurde auch von anderen Autoren als diagnostisches Merkmal für *Nocardioide*-Arten beschrieben (O'Donnell et al., 1982; Miller et al., 1991; Yoon et al., 1997). Im Gegensatz zu diesen Veröffentlichungen wurden in den hier getrennt analysierten Glyko- und Phospholipiden keine weiteren 10-Methylverzweigten Fettsäuren mit geringerer Kettenlänge nachgewiesen. Die zweite Gruppierung innerhalb der Gruppe II stellten die Stämme der Gattung *Aeromicrobium* dar. Diese Gattung wies signifikante Anteile an Hexadecansäure, Octadecensäuren und TBSA auf. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Literaturdaten (Miller et al., 1991), obwohl auch in diesem Fall, wie schon bei den *Nocardioide*-Stämmen, deutliche quantitative Abweichungen zu verzeichnen waren. Dies betraf insbesondere die Fettsäure 18:0, bei der die publizierten Anteile weit unter den hier beobachteten lagen (Miller et al., 1991; Tamura et al., 1994). Zusammenfassend ist festzustellen, daß es sich bei 16:0i, 16:0, Octadecensäuren und TBSA um die diagnostischen Fettsäuren bei der Unterscheidung der Gattungen *Aeromicrobium* und *Nocardioide* handelt.

Terrabacter tumescens nahm innerhalb der Gruppe II eine Sonderstellung ein. Das Fettsäureprofil war äußerst komplex aus den verschiedensten unverzweigt-gesättigten, einfachungesättigten sowie iso- und anteiso-verzweigten Fettsäuren zusammengesetzt. Eine Unterscheidung von den Gattungen *Aeromicrobium* und *Nocardioide* konnte eindeutig durch das Fehlen der TBSA und die Anwesenheit von Hepta- und Octadecensäuren erfolgen.

Taxonomische Bedeutung

Bei einem Vergleich der Abb. 3.12 und 3.15 ist eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem phylogenetischen Stammbaum, basierend auf 16S rDNA-Sequenzen, und dem Dendrogramm der kombinierten Fettsäuredaten der Phospho- und Glykolipide festzustellen. Die verwandtschaftlichen Beziehungen der analysierten Gattungen sind dabei wie folgt zusammenzufassen:

Sowohl der phylogenetische Stammbaum (Abb. 3.12) als auch die auf der Fettsäurezusammensetzung basierenden Dendrogramme (Abb. 3.13-3.15) zeigten eine Unterteilung der untersuchten coryneformen Gattungen in zwei Hauptgruppen. Eine abweichende Einteilung wurde dabei nur für die Gattung *Terrabacter* beobachtet, die aufgrund des Fettsäureprofils der Gruppe II (zusammen mit *Nocardioide* und *Aeromicrobium*) zugeordnet wurde, wohingegen sie in phylogenetischer Hinsicht eine engere Verwandtschaft mit der Gruppe I (*Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Agromyces* und insbesondere *Cellulomonas*) aufwies. LL-Diaminopimelinsäure als gemeinsamer charakteristischer Zellwandbestandteil unterstützt die gefundenen chemotaxonomischen Einteilungen und die offensichtliche Diskrepanz zur phylogenetischen Position dieser Gattung.

4.1.2 Profile der intakten polaren Lipide

Die Zusammensetzung der polaren Lipide (Phospho- und Glykolipide) wird seit vielen Jahren zur Klassifizierung coryneformer Bakterien herangezogen (Shaw und Stead, 1971; Lechevalier, 1977; Minnikin et al., 1979; Collins et al., 1980a,b, 1982; O'Donnell et al., 1982; Collins und Kroppenstedt, 1983). Dabei beschränkte sich die Analyse bisher auf die ein- oder zweidimensionale dünnschichtchromatographische Auftrennung und anschließende Identifizierung der verschiedenen Lipidtypen. Die große strukturelle Vielfalt der polaren Lipide, wie sie von Abraham und Mitarbeitern (1997) beschrieben wurde, konnte hierdurch nicht erfaßt werden. Fortschritte in der Massenspektrometrie ermöglichen heute jedoch auch die Untersuchung komplexer Lipidmischungen. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse der polaren Lipide ging es somit neben der Identifizierung der verschiedenen Lipidtypen vor allem um die Erfassung zusätzlicher Strukturinformationen und die elektronische Datenaufnahme der einzelnen Komponenten. Es wurde eine Datenbank aufgebaut, die die Kombination der Lipiddaten mit anderen chemotaxonomischen Parametern gewährleistet und eine multivariate Auswertung ermöglicht. Es wurde erwartet, daß die zusätzlichen Strukturinformationen die Eignung der polaren Lipide als chemotaxonomisches Kriterium erhöhen würde. Wichtige Hinweise lieferte diesbezüglich die detaillierte massenspektroskopische Analyse der Phospho- und Glykolipide der Gattung *Caulobacter*. Die Methode konnte erfolgreich zur schnellen und zuverlässigen Einteilung der sehr einheitlich und charakteristisch geformten Caulobakterien in verschiedene Gruppen angewendet werden (Abraham et al., 1997), die in ihrer Zusammensetzung die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse widerspiegeln (Abraham et al., 1999). Unter diesen Voraussetzungen wurden die Glyko- und Phospholipide aller 130 Referenzstämme massenspektroskopisch charakterisiert. Die elektronische Datenerfassung beschränkte sich jedoch auf die Phospholipide, da sie sich durch eine höhere Variation zwischen den Arten auszeichneten. Sie sollen daher auch im Mittelpunkt der Diskussion stehen. Die Gattungen *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Agromyces* und *Microbacterium* zeigten ein sehr einheitliches Profil von Lipidtypen, welches vorwiegend aus Phosphatidylglycerinen (PG) und Cardiolipinen bestand. Ein genauerer Vergleich der Lipidzusammensetzung machte deutlich, daß die Unterschiede zwischen diesen Gattungen hauptsächlich auf verschiedene an den Lipiden gebundene Fettsäuren zurückgeführt werden konnten, die sich in den Variationen der PGs und Cardiolipinen widerspiegeln. Die Gattung *Cellulomonas* setzte sich hiervon durch sehr große Anteile an Cardiolipinen und das zusätzliche Auftreten von Fragmentationen dieser Verbindungen ab. Deutlich andere Profile ergaben die Analysen der intakten Phospholipidfraktionen der *Nocardioide*s und *Aeromicrobium*-Stämme. Sie unterschieden sich von den anderen Gattungen durch das Vorhandensein von Phosphatidylinositolen und das Fehlen von Cardiolipinen. Diese beobachteten Charakteristika werden durch das in Abb. 3.16 dargestellte Dendrogramm nur unzureichend wiedergegeben. Die vorhandenen Gruppierungen sind durch die vielen Überschneidungen der einzelnen Gattungen wenig

aussagekräftig. Eine wesentlich stabilere Gruppierung wurde erhalten, wenn nicht nur die Typstämme, sondern der komplette Datensatz in die Berechnung einbezogen wurde. Insgesamt muß aber festgestellt werden, daß die Zusammensetzung der Phospholipide in Verbindung mit der hier eingesetzten Strategie zur Auswertung der Daten für eine Identifizierung auf Gattungsebene nicht ausreichend ist.

Taxonomische Bedeutung

Die als Dendrogramm dargestellten Ergebnisse der massenspektroskopisch analysierten intakten polaren Lipide (s. Abb. 3.16) erwecken den Eindruck, daß keine Übereinstimmung mit den phylogenetischen Daten (s. Abb. 3.12) bestand. Im Gegensatz zur Analyse der zellulären Fettsäuren, die parallel zur phylogenetischen Situation eine klare Differenzierung der untersuchten Gattungen in zwei Großgruppen lieferte, konnten anhand dieser Auswertung keine Abtrennung der coryneformen Bakterien mit Diaminopimelinsäure als charakteristischen Zellwandbestandteil erzielt werden. Ein optischer Vergleich der Spektren sowie die Analyse der Rohdaten verdeutlichte jedoch, daß eine Differenzierung der Gattungen *Nocardioides* und *Aeromicrobium* sehr wohl durch das Fehlen der Cardiolipine und das Auftreten von Phosphatidylinositolen möglich ist. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf den fehlenden Algorithmus für eine geeignete Beurteilung der Spektren zurückzuführen.

4.1.3 16S rDNA-Sequenzierung

Die vergleichende 16S rDNA-Sequenzanalyse ist derzeit die Methode der Wahl zur Untersuchung phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Mikroorganismen. Die Gründe hierfür sind in der hohen Reproduzierbarkeit, der mittlerweile stark optimierten und vereinfachten Sequenziertechnik (Lee et al., 1992) und der ständig wachsenden Datenbanken zu finden (Stoesser et al., 1998). Die rRNA-Gene sind als phylogenetische Markermoleküle besonders gut geeignet, da sie in allen Zellen vorhanden und aufgrund ihrer zentralen Funktion in der Proteinbiosynthese stark konserviert sind. Ihre Basensequenz wird weder durch Degeneration des genetischen Codes noch durch Suppressor-Mutationen beeinflusst. Die rRNA-Gene erfüllen somit alle Anforderungen, die an einen phylogenetischen Marker zu stellen sind. Zusammen mit den variablen und hypervariablen Regionen, die sie ebenfalls aufweisen, ist eine Einteilung der Bakterien meist bis auf Spezies oder Subspeziesebene möglich (Woese, 1987, Stackebrandt und Göbel, 1994).

Die 16S rDNA-Sequenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst dazu eingesetzt, die vorhandenen Datenbanken im Bereich der ausgewählten Referenzorganismen zu komplettieren, um eine möglichst große Übereinstimmung der verschiedenen Datensätze und damit eine gute Vergleichbarkeit der methodischen Ansätze untereinander sicherzustellen. Eine wichtige Rolle spielte die Sequenzierung weiterhin bei der Überprüfung der Authentizität der Referenzstämmen, da diese eine der wichtigsten Voraussetzungen für die

Zuverlässigkeit von Identifizierungsdatenbanken darstellt, die auf chemotaxonomischen Eigenschaften basieren.

Nicht zuletzt wurde die 16S rDNA-Sequenzierung zur Identifizierung und phylogenetischen Einordnung verschiedener Isolate genutzt. Die polyphasische Analyse ausgewählter Isolate wird im folgenden Kapitel behandelt werden.

4.1.4 Polyphasische Analyse ausgewählter Isolate

Da für die Stämme, die von Dr. Ingrid Groth zur Verfügung gestellt wurden, die umfangreichsten Datensätze vorlagen, beschränkt sich die Diskussion auf die polyphasische Analyse dieser Isolate. In Tab. 4.1 wurden die verschiedenen analysierten Parameter zusammengestellt. Ergänzende Informationen zu den Sequenzierungsergebnissen sind den Tab. 3.34-3.36 zu entnehmen.

Ein Vergleich der Ergebnisse zeigte, daß die aufgrund verschiedener phänotypischer Merkmale vorgenommene Identifizierung in den überwiegenden Fällen durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Abweichungen traten vorwiegend im phylogenetischen Bereich der Gattungen *Cellulomonas*, *Oerskovia* und *Promicromonospora* auf. Hierbei muß jedoch erwähnt werden, daß in diesem phylogenetischen Umfeld taxonomische Unklarheiten bestanden, die auch heute noch nicht vollständig geklärt sind (Schleifer und Kandler, 1972; Stackebrandt et al., 1978; Stackebrandt et al., 1980; Rainey et al., 1995). DNA-DNA Hybridisierungsstudien und 16S rDNA-Sequenzvergleiche offenbarten die enge Verwandtschaft der Gattungen *Cellulomonas* und *Oerskovia* (Stackebrandt et al., 1980). Diese Ergebnisse mündeten schließlich trotz einiger morphologischer und phänotypischer Unterschiede in der Überführung der *Oerskovia*-Stämme in die erweiterte Gattung *Cellulomonas* (Stackebrandt et al., 1982). Bei einer erweiterten Analyse der Familie *Cellulomonadaceae* stellten Rainey und Mitarbeiter (1995) fest, daß *Promicromonospora citrea* als Typart dieser Gattung mit *Cellulomonas cellulans* gruppierte, wohingegen *P. enterophila* einen hohen Verwandtschaftsgrad zu *Ce. turbata* aufwies (Sequenzähnlichkeit 99,4%). Hier müßten weitergehende Untersuchungen erfolgen, um über eine Verbindung dieser beiden Gattungen endgültig entscheiden zu können. Alle Isolate in diesem Bereich zeigten das für *Cellulomans*-Arten typische Fettsäureprofil, welches sich vor allem aus 15:0a, 17:0a und 16:0, aber auch auffälligen Anteilen an 14:0 zusammensetzte.

Tab. 4.1: Zusammenstellung der analysierten chemotaxonomischen Charakteristika ausgewählter Isolate.

| LMG-Nr. | DAP ^a | Menachinone ^a | Diaminosäuren der Zellwand ^a | Identifizierung ^a | Identifizierung durch 16S rDNA-Sequenzierung | Fettsäuren | Identifizierung |
|---------|------------------|--|---|--------------------------------|--|---|--------------------|
| 17246 | LL | MK-9H ₄ | | <i>Aeromicrobium</i> | <i>Ae. fastidiosum</i> | 18:0,18:1,16:0,TBSA,17:0 | <i>Ae.</i> |
| 17247 | | MK-12,11 | DAB, Gly,Glu,Ala | <i>Agromyces</i> | <i>Mi. testaceum</i> | 17:0a,15:0a,16:0i,17:0i,16:0,15:0i | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17248 | | MK-11,12 | DAB, Gly,Glu,Ala | <i>Agromyces</i> | <i>Mi. lacticum</i> | 17:0a,15:0a,16:0i | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17249 | | MK-11,10 | DAB, Gly,Glu,Ala | <i>Agromyces</i> | <i>Clav. xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i> | 17:0a,15:0a,16:0i | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17250 | | MK-11,12,10 | DAB, Gly,Glu,Ala | <i>Agromyces</i> | <i>Clav. xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i> | 17:0a,15:0a,16:0i | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17252 | | MK-12,13 | DAB, Gly,Glu,Ala | <i>Agromyces</i> | <i>Ag. ramosus</i> | 17:0a,15:0a,16:0i | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17253 | | MK-12,11,13,10 | DAB, Gly,Glu,Ala | <i>Agromyces</i> | <i>Clav. xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i> | 17:0a,15:0a,16:0i,16:0 | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17255 | | MK-9H ₂ ,10H ₂ ,9,8H ₂ | Lys, Glu, Ala | <i>Arthrobacter</i> | <i>Ar. oxydans</i> | 15:0a,17:0a,16:0,15:0i,16:0i,17:0i | <i>Ar.</i> |
| 17256 | | MK-9H ₂ ,10H ₂ ,8H ₂ | Lys, Glu, Ala | <i>Arthrobacter</i> | <i>Ar. ramosus</i> | 15:0a,17:0a,15:0i,16:0,17:0i,16:0i | <i>Ar.</i> |
| 17257 | | MK-9H ₂ ,10H ₂ ,7H ₂ ,8H ₂ | Lys, Glu, Ala, Ser | <i>Arthrobacter</i> | <i>Ar. atrocyaneus</i> | 18:1,16:0,15:0a,17:0a | ? |
| 17260 | LL | MK-14,13,9H ₂ ,12 | Orn, Gly, Ala | <i>Aureobacterium</i> | <i>Mi. liquefaciens</i> | 15:0a,17:0a,17:0i,15:0i,16:0i | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17263 | | MK-9H ₄ | Orn, Gly, Glu, Ala | <i>Cellulomonas</i> | <i>Ce. flavigena</i> | 15:0a,16:0,17:0a,15:0i,14:0,16:0i | <i>Ce.</i> |
| 17267 | | MK-9,8,10 | Orn, Gly, Glu, Ala | <i>Curtobacterium</i> | <i>Cu. luteum</i> | 17:0a,15:0a,16:0i | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17270 | | MK-12,11,13,9 | Lys, Glu, Ala | <i>Microbacterium</i> | <i>Mi. lacticum</i> | 17:0a,15:0a,16:0i,17:0i,15:0i,16:0 | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17271 | | MK-11,12,10 | Lys, Glu, Ala | <i>Microbacterium</i> | <i>Mi. lacticum</i> | 15:0a,17:0a,16:0i,17:0i,16:0,15:0i | <i>Mi./Ag./Cu.</i> |
| 17272 | | n.d. ^b | | <i>Nocardioides</i> | <i>Ae. erythreum</i> | 18:1,18:0,16:0,TBSA,17:0 | <i>Ae.</i> |
| 17274 | | MK-8H ₄ | | <i>Nocardioides</i> | <i>No. albus</i> | 16:0i,18:1,17:0a,16:0,18:0,17:0,16:1,17:0i,TBSA | <i>No.</i> |
| 17275 | | MK-9H ₄ ,9H ₂ | Lys, Glu, Ala | <i>Oerskovia</i> | <i>Ce. turbata</i> | 15:0a,16:0,17:0a,16:0i,14:0,15:0i | <i>Ce.</i> |
| 17276 | | MK-9H ₄ | Lys, Asp, Glu, Ala | <i>Oerskovia</i> | <i>Ce. cellulans</i> | 15:0a,17:0a,16:0,16:0i,14:0 | <i>Ce.</i> |
| 17277 | | MK-9H ₄ ,9H ₂ | Lys, Asp, Glu, Ala | <i>Oerskovia/Promicrom.</i> | <i>Ce. cellulans</i> | 15:0a,16:0,17:0a,16:0i,15:0i,14:0 | <i>Ce.</i> |
| 17278 | meso | MK-9H ₄ | Lys, Glu, Ala | <i>Oerskovia/Promicrom.</i> | <i>Pr. enterophila</i> | 15:0a,16:0,17:0a,14:0,16:0i,15:0i | <i>Ce.</i> |
| 17279 | | MK-9H ₄ ,8H ₄ | Lys, Asp, Glu, Ala | <i>Oerskovia/Promicrom.</i> | <i>Ce. cellulans</i> | 15:0a,17:0a,16:0,16:0i,15:0i,14:0 | <i>Ce.</i> |
| 17280 | | MK-9H ₄ | Lys, Asp, Glu, Ala | <i>Promicromicromonospora.</i> | <i>Ce. cellulans</i> | 15:0a,17:0a,16:0i,16:0,15:0i | <i>Ce.</i> |
| 17281 | | MK-9H ₄ ,8H ₄ | | <i>Promicromicromonospora</i> | <i>Ce. cellulans</i> | 17:0a,15:0a,16:0,16:0i,15:0i | <i>Ce.</i> |
| 17283 | | MK-8H ₄ | | <i>Terrabacter</i> | <i>Ce. cellulans</i> | 15:0a,17:0a,16:0,16:0i,15:0i | <i>Ce.</i> |

^a Diese Daten wurden von Dr. I. Groth zur Verfügung gestellt.

^b n.d. = nicht bestimmt

Auch im Bereich der Gattung *Arthrobacter* deckten sich die aufgrund unterschiedlicher Ansätze vorgenommenen Identifizierungen. Der Stamm LMG 17257 fiel wegen des sehr ungewöhnlichen Fettsäuremusters auf und konnte anhand dieses Kriteriums keiner Gattung zugeordnet werden. Eine weitere interessante Gruppe stellten die aufgrund chemotaxonomischer Charakteristika der Gattung *Agromyces* zugeordneten Stämme dar. Auf den ersten Blick schien in diesem phylogenetischen Bereich eine hohe Wahrscheinlichkeit der Fehlidentifizierung zu bestehen. Dieser Eindruck relativierte sich jedoch bei einer genaueren Analyse, da Abb. 3.19 veranschaulichte, daß die phylogenetische Position der Spezies *Clavibacter xyli subsp. cynodontis* DSM 46306T bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht endgültig geklärt werden konnte. Dies geht auch aus einer kürzlich veröffentlichten Studie hervor (Sazaki et al., 1998). Die Autoren stellten im Rahmen ihrer Untersuchungen eine hohe Verwandtschaft dieser Spezies zu "*Corynebacterium aquaticum*" fest. Zusammen bildeten diese beiden Arten eine eigene, von den anderen *Clavibacter*-Stämmen völlig unabhängige Gruppierung im phylogenetischen Stammbaum, die eine vergleichsweise enge Verwandtschaft zur Gattung *Agromyces* aufwies. Sazaki und Mitarbeiter schlugen daraufhin die Einführung einer neuen Gattung vor, in der diese beiden Spezies zusammengefaßt werden sollten. Unerklärlich sind die beobachteten Diskrepanzen bei den Identifizierungen der Stämme LMG 17247 und 17248. Diaminobuttersäure als Zellwandbestandteil sollte prinzipiell eine taxonomische Einordnung in die Gattung *Microbacterium* ausschließen. Da sich die Fettsäureprofile der Gattungen *Microbacterium* und *Agromyces* qualitativer und quantitativer Art stark ähneln, konnte auch dieses Kriterium für keine Klärung sorgen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die polyphasische Einordnung verschiedener Umweltisolate eine befriedigende Übereinstimmung der chemotaxonomischen Charakteristika mit der phylogenetischen Einordnung zeigte. Es wurde aber auch offenkundig, daß eine eindeutige Identifizierung unbekannter Organismen aufgrund der analysierten Fettsäuren der Phospho- und Glykolipide gerade im Bereich der Gattungen *Microbacterium*, *Agromyces* und *Curtobacterium* nicht möglich war. Noch schwerwiegendere Probleme wurden von Schuppler und Mitarbeitern (1995) berichtet, die bei der Klassifikation nocardioformer Actinomyceten und Mycobakterien durch vergleichende GC- und 16S rRNA-Analyse erhebliche Differenzen zwischen diesen beiden Ansätzen festgestellt hatten.

4.1.5 Vergleich der Methoden

Die Diskussion der Ergebnisse verdeutlichte, daß die zur Identifizierung und Klassifizierung ausgewählter coryneformer Bakterien eingesetzten Untersuchungsmethoden zu einer Vielzahl unterschiedlichster Resultate führten. Die Methoden zeigten dabei bezüglich ihres Informationsgehaltes bzw. ihres Auflösungsvermögens, ihrer Reproduzierbarkeit sowie des Arbeits- und Zeitaufwandes deutliche Unterschiede. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren sollen die verschiedenen Ansätze daher im folgenden miteinander verglichen werden.

Auflösungsvermögen

Die 16S rDNA-Sequenzierung ist unter den hier vorgestellten Methoden zur Identifizierung und Klassifizierung sicherlich diejenige mit dem höchsten Informationsgehalt. Mit Hilfe dieser Methode war es zum einen möglich, die verschiedenen Gattungen der coryneformen Bakterien klar voneinander abzugrenzen, zum anderen wurden aber auch intragattungsspezifische Verwandtschaftsverhältnisse offensichtlich. Bei der phylogenetischen Einordnung von Isolaten kann auf eine ständig anwachsende Datenbank zurückgegriffen werden, wodurch die Auflösung zumeist bis hin zum Artniveau reicht. Ein großer Vorteil ist dabei, daß die Daten aus allen Laboren der Welt miteinander verglichen werden können, da die 16S rDNA-Sequenzen von Wachstumsbedingungen oder analytischen Methoden unabhängig sind. Der offensichtliche Nutzen der 16S rDNA-Sequenzen darf aber nicht dazu verleiten, ihre Aussagekraft zu überschätzen. Für die Klassifizierung sehr eng verwandter Arten reicht das Auflösungsvermögen der 16S rDNA-Sequenzen nicht aus, da auch verschiedene Bakterienarten identische Sequenzen aufweisen können (Fox et al., 1992). In diesem Fall sind zusätzliche Informationen notwendig, wie sie z.B. durch DNA-DNA-Hybridisierungsexperimente erhalten werden können. Darüber hinausgehend muß bedacht werden, daß jeder Basenunterschied zwischen zwei Sequenzen an einer homologen Position nur ein einziges evolutionäres Ereignis repräsentiert. Daher bleibt der Hauptteil der sich tatsächlich zugetragenen Ereignisse insbesondere an Positionen, die durch eine hohe Frequenz des Basenaustausches charakterisiert sind, nicht bestimmbar. Dies verdeutlicht, daß im Vergleich zu 3-4 Milliarden Jahren der Evolution von Organismen die Anzahl der Positionen und der dort detektierbaren Zustände stark limitiert ist (Ludwig et al., 1998). In den letzten Jahren rückt auch der Polymorphismus von Allelen in das Interessenfeld. Die Nummer der rRNA-Genregionen (rrn-Operone), die auf dem prokaryotischen Chromosom lokalisiert sind, variiert zwischen den einzelnen Spezies erheblich. Bisher wurde keine Korrelation zwischen rrn-Operonkopienzahl und Genomgröße gefunden. Krawiec und Riley (1990) stellten jedoch fest, daß langsam wachsende Organismen in der Regel eine geringere Kopienzahl aufweisen als schnell wachsende Bakterien. Diese Kopienzahl erstreckt sich über einen weiten Bereich. Während *Bradyrhizobium japonicum* nur eine einzige Kopie aufweist (Kündig et al. 1995), wurden in *Bacillus subtilis* 10 Kopien gefunden (Stewart et al., 1982). Die bisher höchste

Anzahl von 15 verschiedenen rRNA-Genen wurde aus *Clostridium paradoxum* berichtet (Rainey et al., 1996). Daß diese multiplen rRNA-Operone in der Regel einheitliche Sequenzen aufweisen, zeigten die Organismen *Bacillus subtilis* (Ogasawara et al., 1994) oder *Rhodobacter sphaeroides* (Dryden und Kaplan, 1990). In jüngster Vergangenheit mehren sich jedoch Berichte über Heterogenitäten zwischen den Kopien. Beispiele hierfür sind das halophile Archaeobacterium *Haloarcula marismortui* (Mevarech et al., 1989; Dennis et al., 1998), dessen beiden rrn-Operone 5% Sequenzdivergenz aufweisen oder auch die beiden 16S rRNA-Gene von *Thermobispora bispora*, welche sich in 98 Nukleotidpositionen unterscheiden (6.4% Sequenzdivergenz). Diese Heterogenitäten werden durch die Sequenzierung der 16S rDNA einzelner Klone nicht erfaßt; bei der direkten Sequenzierung macht sich das Phänomen durch überlagerte Sequenzabschnitte bemerkbar.

Das Auflösungsvermögen der FAME-Analyse war unter den beschriebenen Bedingungen zwischen Gattungs- und Artniveau anzusetzen. Die Interpretation der Fettsäureprofile, d. h. das Auffinden distinkter taxavarianter Charakteristika, wurde letztendlich durch zwei Faktoren erschwert. Ein bedeutender Punkt war die geringe Anzahl unterschiedlicher Fettsäuren, die in den verschiedenen Gattungen detektiert werden konnte. Sogenannte Markerfettsäuren waren nicht erkennbar, und die Einteilung basierte daher nahezu ausschließlich auf quantitativen Unterschieden. Auf der anderen Seite sorgten die innerartlichen Variationen für ein sehr hohes Hintergrundsignal, das zu einer Destabilisierung des Systems führte.

Bei verschiedenen Stämmen einer Art wurden eigene, gut abgegrenzte Fettsäureprofile beobachtet, die auch bei nochmaligen Anzuchten reproduziert werden konnten. Ein Vergleich z. B. der Chromatogramme und Spektren der in den Kapitel 3.2.1 und 3.4.1 ausführlich beschriebenen Stämme von *Arthrobacter globiformis* oder auch *Cellulomonas turbata* ergab signifikante Diskrepanzen. In diesen Fällen mußte die Authentizität der Stämme durch 16S rDNA-Sequenzierung geklärt werden, um die Frage beantworten zu können, ob es sich um Variationen der analysierten phänotypischen Merkmale oder um Ergebnisse falsch identifizierter Stämme handelte. Der Überprüfung der Authentizität der Referenzstämmen kam in der vorgestellten Arbeit eine unerwartet große Bedeutung zu, da sich ein erheblicher Prozentsatz der Referenzorganismen als bisher falsch identifiziert herausstellte. Die FAME-Analyse erwies sich hierbei als eine geeignete Methode, um taxonomische Probleme und Fehlidentifizierungen aufzudecken.

Ebenso wie bei den Fettsäuren behinderte vor allem die geringe Variabilität der Zusammensetzung der polaren Lipide das Auffinden taxaspezifischer Profile. Die Unterschiede beruhten fast ausschließlich auf der Variation der gebundenen Fettsäuren, da sich die Lipidtypen bis auf wenige Ausnahmen auf Phosphatidylglycerine und Cardiolipine beschränkten.

Abschließend ist festzuhalten, daß das unterschiedliche Auflösungsvermögen der chemotaxonomischen Methoden im Vergleich zur 16S rDNA-Sequenzierung eindrucksvoll am Beispiel der analysierten Stämme von *Corynebacterium variabilis* demonstriert wurde. Denn obwohl durch DNA-DNA Hybridisierung eine große Übereinstimmung der Genomsequenzen der Stämme *Corynebacterium variabilis* DSM 20132T und DSM 20536 von 90.5% festgestellt wurde, zeichneten sich die beiden Stämme durch auffällige intraspezifische Lipid- und Fettsäurevariationen aus. Diese Ergebnisse belegen, daß die Analyse der Lipid- und Fettsäurezusammensetzung ein geeignetes Werkzeug darstellen kann, um verschiedene Stämme einer Art zu differenzieren.

Auswerteverfahren

Die 16S rDNA-Sequenzanalyse liefert kultivierungsunabhängige Daten und ermöglicht so die derzeit optimalste phylogenetische Einordnung. Allerdings gibt es auch hier einige kritische Faktoren, die bei der Auswertung der Daten von entscheidender Bedeutung sind.

Das *Alignment* der Sequenzen stellt den ersten Schritt jeder phylogenetischen Analyse dar (James et al., 1989). Ein korrektes *Alignment* stellt sicher, daß nur homologe Positionen miteinander verglichen werden. Hierfür werden die betreffenden Positionen in Spalten angeordnet und später für die Berechnung der phylogenetischen Distanzen und die Konstruktion phylogenetischer Bäume miteinander verglichen. In variablen oder hypervariablen Regionen ist eine eindeutige Zuordnung homologer Positionen häufig schwierig, insbesondere wenn Insertionen oder Deletionen während der evolutionären Entwicklung in diesen Sequenzabschnitten erfolgten. In vielen Fällen stellt die Sekundärstrukturanalyse der rRNA-Moleküle eine geeignete Methode zur Lösung dieses Problems dar (Ludwig und Schleifer, 1995). Sowohl Helices als auch interne und terminale Schleifen können als homologe Elemente erkannt und untereinander ausgerichtet werden, auch wenn sich die Primärstrukturen unterscheiden. Aber selbst unter Berücksichtigung der Sekundärstrukturen kann das *Alignment* unterschiedlich ausgeführt werden. Das *Alignment* ist somit der erste subjektive Schritt der Sequenzanalyse.

Weitere wichtige Einflußgrößen sind bei der Berechnung der aus den bearbeiteten Sequenzen resultierenden phylogenetischen Stammbäume zu bedenken.

Die Topologie der additiven Bäume wird zum einen natürlich durch die Algorithmen beeinflusst, die zur Berechnung der Ähnlichkeitsmatrix herangezogen werden (Fitch und Margolish, 1967; Fitch, 1971; Felsenstein, 1981). In der Regel werden die zuvor berechneten Distanzen im nachfolgenden Schritt in Abhängigkeit von den ihnen zugrundeliegenden Modellen in evolutionäre Distanzen transformiert (Jukes und Cantor, 1969, Jin und Hei, 1990; Swofford und Olsen, 1990). Das in der vorliegenden Arbeit angewendete Modell von Jukes und Cantor (1969) beruht auf der Annahme, daß ein Basenaustausch zufällig stattfindet und zwischen allen vier Nukleotiden gleich wahrscheinlich ist. Weiterhin setzt dieser Algorithmus voraus, daß die Anzahl der detektierbaren Basenaustausche in den heutigen Sequenzen

geringer ist als die tatsächlich erfolgten Ereignisse in der Evolutionsgeschichte (Ludwig et al. 1998).

Daneben ist für die Topologie phylogenetischer Stammbäume die Auswahl der in die Berechnung eingehenden Sequenzabschnitte von entscheidender Bedeutung. Diese Selektion sollte sich nach dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der zu analysierenden Organismen richten. Invariante oder stark konservierte Regionen sind zwar für das *Alignment* der Sequenzen sehr hilfreich und kennzeichnen bestehende Homologien, weisen jedoch einen geringen phylogenetischen Informationsgehalt auf. Auf der anderen Seite sollten hypervariable Regionen von der Berechnung ausgeschlossen werden, da sie zu einer Unterschätzung entfernterer Verwandtschaftsverhältnisse führen. Je höher die Verwandtschaftsgrade zwischen den Mikroorganismen sind, desto größer ist die Anzahl konservierter Regionen. Sequenzunterschiede sind in diesen Fällen nur noch in den variablen Regionen zu finden. Aus den genannten Gründen sollte die Berechnungsgrundlage stets an den zu vergleichenden Sequenzen ausgerichtet werden (Stackebrandt und Rainey, 1995; Ludwig und Schleifer, 1995). Der Einfluß der verschiedenen Sequenzabschnitte sollte dabei durch die sukzessive Entfernung (hyper)variabler Regionen überprüft werden. Dies kann durch den Einsatz verschiedener Masken und Filter erfolgen (Swofford et al., 1990; Maidak et al., 1994; Strunk et al., 1997).

Es sollte weiterhin bedacht werden, daß das Hinzufügen einzelner Sequenzen zu einem bestehenden Datensatz die Topologie des Stammbaumes verändert. Die Aufnahme zusätzlicher Informationen führt zumeist zu einer globalen oder lokalen Stabilisierung, kann aber auch die Destabilisierung von Gruppierungen verursachen. Eine positive Wirkung wird vor allem bei Zweigen beobachtet, die durch einzelne Organismen repräsentiert werden und daher häufig sehr labil sind. Hier erweist sich wieder einmal die sehr umfangreiche Datenbank von 16S rDNA-Sequenzen als großer Vorteil, da die Aufnahme von Sequenzen möglichst eng verwandter Taxa in der Regel mit einer Stabilisierung verbunden ist (Stackebrandt und Rainey, 1995; Ludwig et al., 1998).

Bei der Analyse der Fettsäuredaten wurde offensichtlich, daß die berechneten Dendrogramme nicht alle Informationen widerspiegeln, in manchen Fällen sogar einen falschen Eindruck vermitteln. Allein die Reduzierung des Datensatzes auf die Typstämme war mit einem hohen Informationsverlust verbunden. Die vollständigen Dendrogramme, welche aus Übersichtsgründen hier nicht dargestellt wurden, waren durch ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen gekennzeichnet. Eine Einordnung unbekannter Stämme aufgrund des Fettsäuremusters konnte weitaus zuverlässiger auf Basis der relativen Häufigkeiten einzelner FAMES erfolgen. Vauterin und Mitarbeiter (1996) nannten die folgenden Probleme, die den Wert der FAME-Daten limitieren, wenn diese für taxonomische Zwecke als Dendrogramme dargestellt werden: a) Bei Verwendung Euklidischer Distanzen oder verwandter Ähnlichkeitskoeffizienten, haben die Hauptfettsäuren (d.h. die Fettsäuren, die in großen Mengen vorliegen) das höchste Gewicht bei der Berechnung der Ähnlichkeitswerte, wohingegen die

Fettsäuren, die zwar in geringen Mengen vorliegen, aber für eine Unterscheidung von besonderem Interesse sein könnten, einen geringen Einfluß haben und b) einige Fettsäuren sind als taxonomische Marker aufschlußreich, wohingegen andere von Stamm zu Stamm variieren. Eine gleich starke Gewichtung aller Fettsäuren kann die Maskierung der taxonomisch wichtigen verursachen.

Die Schwankungen des Auflösungsvermögens in Abhängigkeit von der Größe des Datensatzes, wie sie auch bei den FAB-Daten zu beobachten waren, geben aber auch deutliche Hinweise darauf, daß die Leistungsfähigkeit dieser Methoden durch Weiterentwicklungen bei den Auswertesystemen deutlich gesteigert werden kann. Einen interessanten Ansatz liefern diesbezüglich z. B. die Arbeiten von Bertone et al. (1996). Sie nutzten neuronale Netze zur Identifizierung mariner Isolate. Während dieser Ansatz jedoch ausschließlich die Identifikation der Stämme zum Ziel hatte, strebt die Auswertung in Form von Dendrogrammen zusätzliche Informationen über die taxonomischen Verhältnisse an. Weiterführende Studien könnten Aussagen darüber ermöglichen, ob die neuronalen Netze auch bei der Bearbeitung taxonomischer Fragestellungen einen geeigneten Ansatz darstellen.

Die vorgestellte Studie zeigte, daß die Diversität der coryneformen Bakterien weder anhand rein phylogenetischer noch phänotypischer Merkmale umfassend beschrieben werden kann. Sie ist somit ein weiteres Beispiel dafür, daß die Analyse der Beziehungen zwischen Bakterien stets einen polyphasischen Ansatz erfordert. Dieser sieht die Integration phänotypischer, genotypischer und phylogenetischer Informationen vor (Colwell, 1970). Vandamme und Mitarbeiter (1996) beschreiben die unterschiedlichen Methoden der polyphasischen Taxonomie als verschiedene Fenster, durch die eine Landschaft betrachtet werden kann. Die polyphasische Taxonomie stellt dabei den Versuch dar, die reale Landschaft durch die Verbindung der einzelnen Bilder zu synthetisieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machten zudem deutlich, daß die derzeit zur Verfügung stehenden statistischen Methoden den Anforderungen der modernen Taxonomie nicht gerecht werden. Weiterentwicklungen in diesem Bereich würden wahrscheinlich einen drastischen Anstieg des Informationsgehaltes der erhobenen Datensätze bewirken.

Reproduzierbarkeit

Während die Ergebnisse der 16S rDNA-Sequenzierung als hoch reproduzierbar gelten, sind standardisierte Wachstumsbedingungen (Harwood und Russell, 1984; Radlegde und Wilkinson, 1988, Rose, 1989) und eine definierte Aufarbeitungsmethode (Lambert und Moss, 1983; Orgambide et al., 1993) die wichtigsten Voraussetzungen für die Generierung stabiler Lipid- und Fettsäureprofile. Obwohl auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte, daß bakterielle Fettsäuremuster unter standardisierten Kulturbedingungen gut reproduzierbar sind, wurden für einzelne Fettsäuren Variationskoeffizienten von bis zu 30% beobachtet. Ähnliche Werte wurden auch von Bertone und Mitarbeitern (1996) berichtet. Seit vielen

Jahren ist bekannt, daß zahlreiche exogene Faktoren die Fettsäurezusammensetzung beeinflussen. Diese vorangegangenen Studien beschränkten sich zumeist auf das Verhalten Gram-negativer Organismen. Dabei kristallisierten sich Wachstumstemperatur, Medienzusammensetzung und physiologisches Alter der Zellen als wichtigste Parameter heraus. Bei Wachstum unter Mangelbedingungen stellte man drei grundsätzliche Reaktionen der Zellen fest: a) Erhöhung des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren; b) Erhöhung des Verhältnisses von *trans*- zu *cis*-einfachungesättigten Fettsäuren und c) Erhöhung des Verhältnisses von Cyclopropylfettsäuren zu ihren einfachungesättigten Vorstufen (Marr und Ingraham, 1962; Law et al., 1963). Dagegen zeigten die bisherigen Untersuchungen weniger dramatische Veränderungen bei Gram-positiven Zellen (Kostiw et al., 1972; Kieft et al., 1994). Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Einflüsse auf die Fettsäurezusammensetzung waren vorwiegend quantitativer Natur und konnten nur in einigen Fällen bekannten Trends zugeordnet werden. So führte ein Wachstum bei verminderten Temperaturen in der überwiegenden Zahl der Stämme zu einer vermehrten Bildung ungesättigter und kürzerkettiger Fettsäuren. Man geht heute davon aus, daß diese Regulationen der Erhöhung der Membranfluidität dienen und so das Überleben der Bakterien unter den veränderten Bedingungen ermöglichen (Fulco et al., 1969; Kaneda, 1972; Canillac et al., 1982). Nur in Ausnahmefällen wurden auch qualitative Veränderungen beobachtet.

Die starke Abhängigkeit von exogenen Faktoren erschwert den Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Laboren und somit den Aufbau einer arbeitsgruppenübergreifenden Datenbank erheblich. Daher müssen die Stämme bei Anwendung des kommerziellen MIDI-Systems unter Einhaltung hoch standardisierter Konditionen angezogen werden. Diese strengen Richtlinien können die Identifizierung langsam wachsender Stämme verhindern oder mit einer Verminderung des Auflösungsvermögens einhergehen.

Arbeits- und Zeitaufwand

Von den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Methoden erfordert die FAME-Analyse den höchsten Arbeits- und Zeitaufwand. Eine Auswertung der Daten kann erst nach anderthalb Wochen erfolgen. Dabei stellt die Anzucht der Bakterien nur einen zeitraubenden Faktor dar, wohingegen die nachfolgenden Schritte zusätzlich mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden sind. Etwas geringer ist der Zeitaufwand für die Analyse der intakten polaren Lipide (5 Tage). Die Sequenzierung der 16S rDNA liefert bereits nach 3 Tagen erste Ergebnisse. Berücksichtigt man den vergleichsweise niedrigen Informationsgehalt der Fettsäuren für die Identifizierung von Bakterien, muß der Arbeitsaufwand als zu hoch eingeschätzt werden. Da die getrennte Untersuchung der Fettsäuren aus den Phospho- und Glykolipiden mit keinem höheren Auflösungsvermögen verbunden war, ist das automatisierte MIDI-System für die FAME-Analyse klar vorzuziehen. Dieses System stellt bei gleichem oder sogar höherem Informationsgehalt eine wesentlich schnellere Alternative dar, da die

Ergebnisse schon nach einem Tag vorliegen. Ein weiterer Vorteil des Systems gegenüber einer Analyse der FAMES aus Glyko- und Phospholipide ist die angeschlossene Datenbank, welche insbesondere bei der Identifizierung von Isolaten sehr hilfreich ist.

4.2 Entwicklung von Oligonukleotid-Sonden

Die *in situ* Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonden ermöglicht die direkte und kultivierungsunabhängige Analyse von Mikroorganismen in den verschiedensten Ökosystemen. Hierbei stellt die 16S rDNA durch ihre verschieden stark konservierten Bereiche ein ideales Ziel für die Entwicklung von Sonden unterschiedlicher Spezifität dar (Giovannoni et al., 1988; Amann et al., 1995b). Bei der vorgestellten Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Entwicklung gattungsspezifischer Oligonukleotid-Sonden gelegt, da diese zur *in situ* Hybridisierung von Biofilmen aus PCB-kontaminierten Bodenproben eingesetzt werden sollten. Aufgrund der großen Sequenzähnlichkeiten zwischen den analysierten Gattungen der coryneformen Bakterien war es nicht möglich, für jede Gattung eine geeignete Sonde zu finden. Die entwickelten Sondenvorschläge zeichneten sich alle durch eine geringe Anzahl an Basenfehlpaarungen zu eng verwandten Organismen aus. In der Literatur geht man davon aus, daß Oligonukleotid-Sonden unter sehr stringenten Bedingungen in der Lage sind, zwischen den komplementären und nahezu komplementären Sequenzen auf der Basis eines einzelnen Basenaustausches zu unterscheiden (Manz et al., 1992). Hierbei ist jedoch sowohl die Position des Basenaustausches als auch die jeweilige Basenzusammensetzung von entscheidender Bedeutung. Basenfehlpaarungen wirken sich an den Rändern weniger stabilisierend aus, als wenn sie im inneren Bereich der Zielsequenz lokalisiert sind. Weiterhin konnte man nachweisen, daß die stärkste destabilisierende Wirkung von den Basenpaarungen A-A, T-T, C-T und C-A ausgeht, wohingegen G-T und G-A einen geringen Einfluß haben. *In situ* Hybridisierungen mit den fluoreszenzmarkierten Sonden MIC 841 (Kollöffel et al., 1997), CUR 844 und AER 839 ergaben keine Signale. Da alle Sonden durch die gleiche Zielregion gekennzeichnet waren, wurde angenommen, daß es sich hierbei um einen für Sonden unzugänglichen Sequenzabschnitt handelt. Von einer weiteren Anwendung dieser Sonden wurde abgesehen. MIB 756, CEL 1030 und TER 821 lieferten hingegen hohe Signalintensitäten. Die Stringenz wurde durch die schrittweise Erhöhung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer eingestellt. Allerdings konnte bei den beiden Sonden MIB 756 und CEL 1030 auch bei einer Formamidkonzentration von 45% keine vollständige Diskriminierung erzielt werden. Die Spezifität dieser Sonden wurde daher durch den Einsatz von Kompetitor-Oligonukleotiden gesichert.

Mit der Limitierung der entwickelten Sonden auf den Einsatz bei der *in situ* Hybridisierung wurde die Leistungsfähigkeit dieser Methode nicht ausgeschöpft. Eine weitere Anwendung der Sonden könnte ein Screeningverfahren von Umweltisolaten in Form von Kolonie-Hybridisierungen sein. Eine weitere interessante Perspektive bietet in diesem Zusammenhang

die multiplexe PCR, die auf spezifischen Primern basiert und kürzlich erfolgreich für die schnelle Identifizierung von *Nocardioide*s-Stämmen angewendet wurde (Park et al., 1998). Diesbezüglich ergeben sich noch vielfältige Möglichkeiten, um das Potential der aufgebauten Datenbanken vollständig auszunutzen.

Teil II

Entwicklung, Struktur und Zusammensetzung mikrobieller Biofilme aus unterschiedlich stark PCB-belasteten Bodenproben

Die meisten Mikroorganismen bewegen sich in terrestrischen und aquatischen Ökosystemen nicht frei, sondern sind in Form komplexer, an Oberflächenstrukturen anhaftender Biofilmgemeinschaften organisiert (Whitman et al., 1998). Der Biofilm stellt dabei einen eigenen Lebensraum dar, der durch viele biologische, chemische und physikalische Parameter charakterisiert wird, deren Komplexität man erst langsam zu verstehen lernt. In der Vergangenheit war die Untersuchung natürlicher Biofilmgemeinschaften stets durch die Schwierigkeiten der Identifizierung von Mitgliedern *in situ* sowie die Quantifizierung physikalischer, chemischer und räumlicher Aspekte stark limitiert. Man war nicht in der Lage, spezifisch ablaufende Prozesse mit einzelnen Mikroorganismen in Verbindung zu bringen. Technologische und methodische Fortschritte, hierbei sind insbesondere die Etablierung der konfokalen Lasermikroskopie, die Einführung der *in situ* Hybridisierung und Weiterentwicklungen in der digitalen Bildaufnahme und –auswertung zu nennen, erlauben es heute zunehmend, natürliche Biofilme direkt und zerstörungsfrei zu analysieren und tragen dazu bei, die bestehenden Organisationsformen von Bakterien kennen- und verstehen zu lernen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden phylogenetische Sonden entwickelt, die die Detektion bestimmter Gattungen der coryneformen Bakterien in ihren natürlichen Lebensräumen ermöglichen. Unter den Bodenbakterien sind diese Organismen für ihr hohes katabolisches Potential zur Metabolisierung und Transformation verschiedener Xenobiotica bekannt (Ederer et al., 1997; Bae et al., 1996; McAllister et al., 1996; Higson et al., 1992), unter denen der Abbau von polychlorierten Biphenylen (PCBs) hervorzuheben ist (Kohler et al., 1988; Gilbert und Crowley, 1997). Daher wurden im zweiten Teil dieser Arbeit Biofilme dreier unterschiedlich stark PCB-belasteter Bodenproben in Durchflußzellen aufgezogen und die Entwicklung und Struktur miteinander verglichen. Es wurde erfolgreich eine Methode etabliert und optimiert, die die zerstörungsfreie Analyse bakterieller Biofilmgemeinschaften in Durchflußzellen ermöglicht. Somit wurde eine direkte Verbindung der Lokalisierung bestimmter Spezies zu allen anderen Biofilmcharakteristika geschaffen.

4.3 Durchflußzellen als Modellsystem für die Studie mikrobieller Biofilme

Im Rahmen verschiedenster Studien hat sich gezeigt, daß Durchflußzellensysteme für die Kultivierung und online Analyse mikrobieller Biofilme äußerst wertvoll sind (Korber et al., 1989, 1997; Wolfaardt et al., 1994; Møller et al., 1997). Durch die Anwendung von Mehrkanaldurchflußzellen sind experimentelle Wiederholungen sehr leicht und mit einer optimalen Vergleichbarkeit durchzuführen. Bei den hier beschriebenen Versuchen hatten die Mehrkanaldurchflußzellen den großen Vorteil, daß in einem System zuerst die Entwicklungsstufen der Biofilme verfolgt werden konnten, um anschließend *in situ* Hybridisierungen mit verschiedenen Sondenkombinationen für eine möglichst umfassende Analyse der bakteriellen Gemeinschaft durchzuführen zu können. Es wurde dabei bewußt der Kompromiß eingegangen, daß es sich um Biofilme handelt, die zwar nicht im Ökosystem selbst, aber unter sehr naturnahen Verhältnissen aufgewachsen waren.

4.3.1 Der Einfluß des PCB-Belastungsgrades auf die Entwicklung und Struktur von Biofilmen

Es wurden eine Reihe von Unterschieden bei der Biofilmentwicklung in Abhängigkeit vom Belastungsgrad des Inoculums beobachtet. Diese umfaßten Unterschiede in der Erstbesiedelung und der Wachstumsrate, der Biofilmarchitektur, der Zelldichte und der Zellmorphologie. In den Durchflußzellen mit dem nahezu unbelasteten Boden und der am höchsten belasteten Variante war eine starke Neigung zur Ausbildung von Zellclustern festzustellen. Das weitere Wachstum ging von diesen Zellansammlungen aus. Die Biofilme waren daher recht unregelmäßig geformt und zeigten eine hohe Variabilität der Tiefe. Obwohl sich also die beiden Biofilme aus sehr unterschiedlich stark PCB-belasteten Bodenproben in dieser Hinsicht glichen, ist die Entstehung der beobachteten Architektur vermutlich auf distinkte Gründe zurückzuführen. Eine Reihe von Autoren vertreten die Meinung, daß Mikroorganismen von einem Wachstum an der Oberfläche profitieren können, da hier eine Akkumulation von Nährstoffen stattfindet (Kefford et al., 1982; Costerton et al., 1987; Manz et al., 1993). Dies bestätigten auch Studien von Kjelleberg und Mitarbeitern (1984), bei denen das sessile Wachstum von Bakterien durch eine Kohlenstofflimitierung stimuliert wurde. Das Fehlen von Nährstoffen könnte somit eine Erklärung für das geringe Wachstum und die Ausbildung von Zellhügeln in den Durchflußzellen des unbelasteten Bodens liefern. Diese Vermutung stimmt mit dem sehr niedrigen TOC (*total organic carbon*)-Wert von 2.0 [g/kg Boden] überein, der im Boden SK gemessen wurde (analysiert vom Chemischen Laboratorium Dr. E. Weßling, Hannover mittels Königswasseraufschluß [DIN 38414 S7]). Bei der am höchsten belasteten Bodenprobe scheint ein anderer Faktor für die beschriebenen Zellhügel verantwortlich zu sein, da diese auch von Biofilmen bekannt sind, die auf Diclofop (Wolfaardt et al., 1994) und 2,4,6-Trichlorbenzoesäure (Møller et al., 1997) als alleinige Kohlenstoffquelle gewachsen waren; Substraten also, die von Bakterien ähnlich schwer wie

PCBs zu metabolisieren waren. Interessanterweise wurde diese Biofilmarchitektur niemals bei einem Wachstum auf leicht verwertbaren Nährstoffquellen beobachtet. Man geht daher davon aus, daß eine Korrelation zwischen Biofilmarchitektur und Natur der Kohlenstoffquelle besteht (Massol-Deyá et al., 1995). Die enge räumliche Anordnung kann aus mehreren Gründen bei schadstoffabbauenden Biofilmgemeinschaften von Bedeutung sein. So können hierdurch z. B. Akkumulationen von toxischen Zwischenprodukten verhindert (Knackmuss, 1984; Pelz et al., 1999), Nischen für bestimmte Prozesse wie die reduktive Dehalogenierung (Dolfing et al., 1995) gebildet oder Bakterien in direkte Nachbarschaft gebracht werden, deren Abbauewege ineinandergreifen. Es liegt somit die Vermutung nahe, daß die Ausbildung von Zellaggregaten notwendig war, um das direkte Nebeneinander von Organismen, die bei der Metabolisierung der PCBs aufeinander angewiesen waren, zu ermöglichen. Die Aussagen über die Rolle der Zellhügel bleiben jedoch spekulativ, da z. B. nicht geklärt wurde, ob sich diese aus mehreren Spezies zusammensetzten.

Die Variation der Zellmorphologie stieg parallel zum Belastungsgrad an. Während in den Biofilmen des unbelasteten Bodens überwiegend einheitlich geformte Bakterien mit einer durchschnittlichen Größe beobachtet wurden, konnten in den stärker belasteten Proben verschiedene Zellmorphologien unterschieden werden. Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, daß eine deutliche Abhängigkeit der Artenzusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft vom Belastungsgrad des Inoculums bestand. Diese Erklärungen stehen im Einklang mit ersten Ergebnissen von Dr. Mark Osborn (GBF, AG Mikrobielle Ökologie), der derzeit die taxonomische Struktur der bakteriellen Gemeinschaften in den unterschiedlich stark kontaminierten Bodenproben mit Hilfe einer molekularbiologischen DNA-Fingerprinttechnik (RFLP) analysiert. Abschließende Aussagen können jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht getroffen werden.

4.3.2 *In situ* Hybridisierung von Biofilmen in Durchflußzellen

Für die direkte Analyse der bakteriellen Zusammensetzung der Biofilme aus unterschiedlich stark PCB-belasteten Bodenproben wurde die *in situ* Hybridisierung eingesetzt. Diese Nachweismethode von Einzelzellen unter Verwendung fluoreszenzmarkierter phylogenetischer Sonden wurde von DeLong und Mitarbeitern (1989) entwickelt. Seitdem spielt sie eine große Rolle in der mikrobiellen Ökologie, z. B. bei der Identifizierung von bislang nicht kultivierbaren Organismen (Amann et al., 1995a) oder der Analyse komplexer bakterieller Gemeinschaften in ihrer natürlichen Umgebung (Amann et al., 1991; Wagner et al., 1993, Manz et al., 1992, 1993). Ausgehend von den heutzutage standardmäßig durchgeführten Schritten (Amann et al., 1995a), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die die *in situ* Analyse von Biofilmgemeinschaften direkt in den Durchflußzellen ermöglicht.

4.3.3 Analyse der bakteriellen Zusammensetzung natürlicher Biofilme mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung

Eine direkte Übertragung der an Modellgemeinschaften entwickelten Methode auf die Analyse natürlicher Biofilme war nicht möglich. Die Signalintensitäten waren sehr viel schwächer, wodurch die Auswertung stark eingeschränkt wurde. In der Literatur ist schon seit längerer Zeit beschrieben, daß es sich hierbei um ein potentiell Problem bei der Analyse von Umweltproben handelt, insbesondere wenn sie aus nährstoffarmen Habitaten stammen. Schwache Signale können durch eine verminderte Zellpermeabilität, die Unzugänglichkeit der Zielregion aufgrund starker Wechselwirkungen mit ribosomalen Proteinen oder sehr stabilen Sekundärstrukturen innerhalb der rRNA-Moleküle, aber auch einen niedrigen Ribosomengehalt der Zellen infolge von Nährstofflimitierung (Poulsen et al., 1993) verursacht werden. Zur Erhöhung der Signalintensitäten wurden einige Parameter optimiert, die im folgenden diskutiert werden sollen.

Sondenkonzentration

Die Erhöhung der eingesetzten Sondenkonzentration um bis zu zwei Zehnerpotenzen im Vergleich zu den analysierten Modellbiofilmen brachte keine Verstärkung der Signale mit sich. Es konnte somit ausgeschlossen werden, daß die niedrigen Signalintensitäten durch unzureichende Sondenmengen verursacht wurden.

Zellpermeabilität

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden verschiedene Fixierungsprotokolle für die Zellstabilisierung und Membranpermeabilisierung publiziert, die das Eindringen der Oligonukleotide und die morphologische Integrität der Zellen gewährleisten sollen. Während die Fixierung mit einer 4%igen Formaldehydlösung sich als Standardprozedur für Gram-negative Zellen etabliert hat, bleibt die Visualisierung einiger Gram-positiver Bakterien nach wie vor problematisch. Die hydrophoben Zellwände dieser Organismen sind weitaus schwieriger zu permeabilisieren. Bisher wurden enzymatische Verdauungsschritte (Schuppler et al., 1998; Hönerlage et al., 1995), eine säurekatalysierte milde Hydrolyse (MacNaughton et al., 1994) und Kombinationen dieser beiden Ansätze eingesetzt, um die Permeabilität bakterieller Zellen zu erhöhen. Weiterhin wurde die Verwendung von Ethanol für eine effektivere Fixierung Gram-positiver Bakterienzellen empfohlen (Braun-Howland, 1992; Roller et al., 1994).

In einer Versuchsreihe wurden verschiedenste Kombinationen getestet, um eine Erhöhung der Signalintensitäten zu erreichen. Dieser Fall trat jedoch mit keiner Variation ein. Eine Impermeabilität der Zellen konnte somit nicht die Ursache für die niedrigen Signalstärken sein. Dies war von vornherein unwahrscheinlich gewesen, da alle zuvor getesteten Gram-positiven Organismen für die Sonden gut zugänglich gewesen waren und ihre Permeabilität in den Biofilmen im Vergleich zu Reinkulturen sogar erhöht zu sein schien.

Ribosomengehalt

In natürlichen Ökosystemen sind Mikroorganismen in der Regel einem extremen Nährstoffmangel ausgesetzt. In diesen nährstoffarmen Umgebungen herrschen langsam wachsende Bakterien mit einer geringen metabolischen Aktivität vor. Die hiermit verbundenen niedrigen Ribosomenzahlen pro Zelle sorgen für ein schwaches Signal bei der *in situ* Hybridisierung. Ouverney und Fuhrmann (1997) berichteten, daß das Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundfluoreszenz durch die Zugabe einer Mischung aus Chloramphenicol ($100 \mu\text{g l}^{-1}$), Glucose (5 g l^{-1}) und Hefeextrakt (5 g l^{-1}) einige Stunden vor der Fixierung deutlich erhöht werden kann. Die Behandlung verursacht eine Vergrößerung des Zellvolumens und eine Erhöhung des Ribosomengehaltes unter gleichzeitiger Unterdrückung der Zellteilung. Diese dramatischen Veränderungen sollten verhindert werden, da die Biofilme so weit wie möglich die natürlichen Verhältnisse am PCB-kontaminierten Standort widerspiegeln sollten. Daher wurde versucht, den Ribosomengehalt mit geringen Mengen an TSB oder Hefeextrakt im Minimalmedium zu stimulieren. Während der Zusatz von TSB nur zu einer deutlichen Veränderung der Zellgröße und der Biofilmstruktur führte, verursachte die Zugabe von 5 mg l^{-1} Hefeextrakt acht Stunden vor der Fixierung eine signifikante Erhöhung der Signalintensität. Die Gründe für diese unterschiedlichen Wirkungen sind bisher nicht bekannt.

4.3.4 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die die Voraussetzung für eine zerstörungsfreie *in situ* Analyse der bakteriellen Zusammensetzung von Biofilmgemeinschaften in Durchflußzellen schafft. Hierbei zeigte sich jedoch, daß gerade die Anwendung FITC-markierter Sonden in natürlichen Ökosystemen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden war. Der Farbstoff wurde durch die Einwirkung von Licht oder des Lasers sehr schnell inaktiviert, selbst in Anwesenheit von Reagenzien, die ein Ausbleichen der Signale verhindern sollten. Wesentlich intensivere und stabilere Fluoreszenzsignale wurden bei den Cy3-markierten Sonden detektiert. Die Ergebnisse machten deutlich, daß für eine umfassende Bearbeitung des Projektes der kombinierte Einsatz von Cy3- und Cy5-markierten Sonden bei gleichzeitiger DAPI-Färbung vonnöten gewesen wäre. Dies war jedoch technisch nicht zu realisieren. Die Entwicklung sensiblerer Detektionsmethoden und Weiterentwicklungen der derzeitigen Farbstoffe gehören sicherlich zu den großen Herausforderungen der nächsten Jahre, um komplexe *in situ* Analysen detailliert durchführen zu können. Vielversprechende Ansätze stellen in diesem Kontext enzymmarkierte Sonden (Amann et al, 1995a; Schönhuber et al., 1997) oder die neuentwickelte Farbstoffserie Alexa dar (Molecular Probes, Eugene, U.S.A.).

5. Zusammenfassung

- In der vorliegenden Arbeit wurde die Leistungsfähigkeit von drei verschiedenen Methoden zur hochauflösenden automatisierten Identifizierung ausgewählter coryneformer Bakterien überprüft. Dazu wurden zunächst Datenbanken aus den separat analysierten Fettsäuren der Phospho- und Glykolipide und den massenspektroskopisch bestimmten polaren Lipidprofilen generiert und mit geeigneten multivariaten statistischen Verfahren ausgewertet. Weiterhin wurden die bestehenden Datenbanken der 16S rRNA/DNA-Sequenzen erweitert und ihr Potential hinsichtlich der Entwicklung gattungsspezifischer phylogenetischer Oligonukleotid-Sonden abgeschätzt. Für den Aufbau der Datenbanken wurden 130 Referenzstämme polyphasisch untersucht.
- Die ausgewählten coryneformen Bakterien konnten anhand ihrer 16S rDNA-Sequenzen differenziert und identifiziert werden, wobei die erzielten Einteilungen im wesentlichen von den chemotaxonomischen Methoden unterstützt wurden. Die Verwendung der Lipid- und Fettsäureprofile erlaubte eine Feindifferenzierung bis auf Stammebene.
- Es konnte gezeigt werden, daß die Kombination der getrennt analysierten Fettsäuren der Phospho- und Glykolipidfraktionen mit keiner höheren Auflösung, als sie die Analyse der gesamtzellulären Fettsäuren bietet, verbunden war.
- Der Vergleich der intakten polaren Lipidprofile lieferte wichtige Hinweise auf mögliche Biomarker. Auf diese Weise wurde eine Reihe bisher nicht beschriebener Verbindungen identifiziert und ihre Struktur durch den kombinierten Einsatz verschiedener spektroskopischer und chromatographischer Methoden aufgeklärt. Diese Signaturbiomoleküle schaffen im Zusammenspiel mit der Isotopenmassenspektroskopie die attraktive Verbindung zwischen der Analyse der Struktur und Funktion mikrobieller Gemeinschaften.
- Eine zuverlässige Differenzierung und Identifizierung konnte in der Regel aufgrund der massenspektroskopischen Analyse der Lipidprofile nicht erfolgen. Nur einzelne Gattungen wie z.B. *Cellulomonas* waren durch eine einheitliche Lipidzusammensetzung gekennzeichnet. Obwohl die Auflösung dieser Methode vermutlich durch zusätzliche Strukturinformationen und verbesserte Algorithmen für eine optimale Auswertung der Spektren erhöht werden könnte, ist ein schnelles Lipidfingerprinting derzeit nicht realisierbar.
- Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, daß aus internationalen Stammsammlungen eine signifikante Anzahl falsch klassifizierter Stämme bezogen wurde, die weit entfernten Gattungen angehörten. Die FAME-Analytik stellte hierbei eine geeignete Methode dar, um Fehlidentifizierungen zu erkennen.
- Es wurden phylogenetische Oligonukleotid-Sonden entwickelt, die eine spezifische *in situ* Detektion der Gattungen *Microbacterium*, *Cellulomonas*/*Promicromonospora* und *Terrabacter* auch in natürlichen Ökosystemen ermöglichen.
- Darüber hinaus wurde die Methode der *in situ* Hybridisierung so optimiert, daß eine Möglichkeit zur direkten Analyse der bakteriellen Zusammensetzung von Biofilmen in Durchflußzellen geschaffen wurde. Die Funktionsfähigkeit dieses Systems konnte erfolgreich am Beispiel der Untersuchung von Biofilmen aus PCB-kontaminierten Bodenproben demonstriert werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abel, K. H., De Schmertzing, H., und J. I. Peterson. 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. *J. Bacteriol.* **85**:1039-1044.
- Abraham, W.-R., Meyer, H., Lindholst, S., Vancanneyt, M., und J. Smit. 1997. Phospho- and sulfolipids as biomarkers of *Caulobacter sensu lato*, *Brevundimonas* and *Hyphomonas*. *System. Appl. Microbiol.* **20**:522-539.
- Abraham, W.-R., Strömpl, C., Meyer, H., Lindholst, S., Moore, E. R. B., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindall, B. J., Bennasar, A., Smit, J., und M. Tesar. 1999. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *M. maris* (Pointdexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, im Druck.
- Altenburger, P., Kämpfer, P., Akimov, V. N., Lubitz, W., und H.-J. Busse. 1997. Polyamine distribution in actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Tsukamurella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:270-277.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., und D. A. Stahl. 1990a. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**:1919-1925.
- Amann, R. I., Krumholz, L., und D. A. Stahl. 1990b. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762-770.
- Amann, R., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H.-D., und K.-H. Schleifer. 1991. Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351**:161-164.
- Amann, R. I., Ludwig, W., und K.-H. Schleifer. 1995a. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Amann, R. I. 1995b. *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, pp. 1-15. *In*: Akkermans, A. D. L., van Elsas, J. D., und F. D. de Bruijn (ed.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer, Dordrecht.
- Bae, H. S., Lee, J. M., und S.-T. Lee. 1996. Biodegradation of 4-chlorophenol via a hydroquinone pathway by *Arthrobacter ureafaciens* CPR706. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:125-129.
- Bendinger, B., Kroppenstedt, R. M., Klatte, S., und K. Altendorf. 1992. Chemotaxonomic differentiation of coryneform bacteria isolated from biofilters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:474-486.
- Bergey, D. H., Breed, R. S., Hammer R. W., Harrison, F.-C., und F. M. Huntoon. 1923. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 1st ed. The Williams and Wilkins Co.,

- Baltimore.
- Bertone, S., Giacomini, M., Ruggiero, C., Piccarolo, C., und L. Calegari.** 1996. Atomated systems for identification of hetrotrophic marine bacteria on the basis of their fatty acid composition. *Appl. Environm. Microbiol.* **62**:2122-2132.
- Bieszkiewicz, E., Boszczyk-Maleszak, H., Kaczorowska, B., und R. Mycielski.** 1995. Isolation and identification of bacteria from activated sludge purifying petroleum wastewaters. *Acta Microbiol. Pol.* **44**:171-179.
- Bligh, E. G., und W. J. Dyer.** 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.
- Boehnisch, T.** 1989. Background, pp. 21-23. *In*: Naish, S. J. (ed.), *Handbook of immunochemical staining methods*. Dako, Carpinteria, CA, USA.
- Bousfield, I. J., Smith, G. L., Dando, T. R., und G. Hobbs.** 1983. Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **129**:375-394.
- Braun-Howland, E. B., Danielson, S. A., und S. A. Nierzwicki-Bauer.** 1992. Development of a rapid method for detecting bacterial cells in situ using 16S rRNA-targeted probes. *BioTechniques* **13**:928-933.
- Bremer, H., und P. P. Dennis.** 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella tryphimurium*, pp. 1527-1542. *In*: F. C. Neidhardt (ed.), *Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J., und H. F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4801-4805.
- Burggraf, S., Mayer, T., Amann, R., Schadhauer, S., Woese, C. R., und K. O. Stetter.** 1994. Identifying members of the domain *Archae* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**:3112-3119.
- Caldwell, D. E., und J. R. Lawrence.** 1986. Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* microcolonies within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microb. Ecol.* **12**:299-312.
- Caldwell, D. E., Korber, D. R., und J. R. Lawrence.** 1992a. Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion using scanning confocal laser microscopy. *J. Microbiol. Methods* **15**:249-261.
- Caldwell, D. E., Korber, D. R., und J. R. Lawrence.** 1992b. Confocal laser microscopy and computer image analysis. *Adv. Microb. Ecol.* **12**:1-67.
- Canillac, N., Pommier, M. T., und A. M. Gounot.** 1982. Effet de la température d'incubation sur la composition lipidique de Corynébacteriacé du genre *Arthrobacter*. *Can. J. Microb.* **28**:284-290.
- Casellas, M., Grifoll, M., Bayona, J. M., und A. M. Solanas.** 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter sp.* strain F101. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**:819-826.
- Clay, K. L., Wahlin, L., und R. C. Murphy.** 1983. Interlaboratory reproducibility of relative

- abundances of ion currents in Fast Atom Bombardment mass spectral data. *Biomed. Mass Spectrom.* **10**:489-494.
- Conn, H. F., und I. Dimmick.** 1947. Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. *J. Bacteriol.* **54**:291-303.
- Collins, M. D., Goodfellow, M., und D. E. Minnikin.** 1979. Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **110**:127-136.
- Collins, M. D., Goodfellow, M., und D. E. Minnikin.** 1980a. Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of *Curtobacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **118**:29-37.
- Collins, M. D., und D. Jones.** 1980b. Lipids in the classification of coryneform bacteria containing peptidoglycans based on 2,4-diaminobutyric acid (DAB). *J. Appl. Microbiol.* **48**:459-470.
- Collins, M. D., Goodfellow, M., und D. E. Minnikin.** 1982. Polar lipid composition in the classification of *Arthrobacter* and *Microbacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**:299-302.
- Collins, M. D., Jones, D., Keddle, R. M., Kroppenstedt, R. M., und K. H. Schleifer.** 1983a. Classification of some coryneform bacteria in a new genus *Aureobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**:236-252.
- Collins, M. D., Keddle, R. M., und R. M. Kroppenstedt.** 1983b. Lipid composition of *Arthrobacter simplex*, *Arthrobacter tumescens* and possibly related taxa. *System. Appl. Microbiol.* **4**:18-26.
- Collins, M. D., und R. M. Kroppenstedt.** 1983c. Lipid composition as a guide to the classification of some coryneform bacteria-containing an A 4 α type peptidoglycan (Schleifer and Kandler). *System. Appl. Microbiol.* **4**:95-104.
- Collins, M. D., und D. Jones.** 1983d. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. *J. Gen. Microbiol.* **129**:3545-3548.
- Collins, M. D.** 1987. Transfer of *Arthrobacter variabilis* (Müller) to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium variabilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:287-288.
- Collins, M. D., Dorsch, M., und E. Stackebrandt.** 1989a. Transfer of *Pimelobacter tumescens* comb. nov. as *Terrabacter tumescens* comb. nov. and of *Pimelobacter jensenii* to *Nocardioides jensenii* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:1-6.
- Collins, M. D., Smida, J., und E. Stackebrandt.** 1989b. Phylogenetic evidence for the transfer of *Caseobacter polymorphus* (Crombach) to the genus *Corynebacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:7-9.
- Colwell, R. R.** 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* **104**:410-433.
- Costerton, J. W., Cheng, K.-J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., und J. T. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**:435-464.

- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K., und R. W. Harris.** 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:107-117.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., und N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**:1360-1363.
- De Los Reyes, F. L., Ritter, W., und L. Raskin.** 1997. Group-specific small subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**:1107-1117.
- Dennis, P. D., Ziesche, S., und S. Mylvaganam.** 1998. Transcription analysis of two disparate rRNA operons in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *J. Bacteriol.* **180**:4804-4813.
- Döpfer, H. Stackebrandt, E., und F. Fiedler.** 1982. Nucleic acid hybridization studies on *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Agromyces* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **128**:1697-1708.
- Dolfing, J., und J. E. M. Beurskens.** 1995. The microbial logic and environment significance of reductive dehalogenation. *Adv. Microb. Ecol.* **14**:143-206.
- O'Donnell, A., Goodfellow, M., und D. E. Minnikin.** 1982. Lipids in the classification of *Nocardioides*: Reclassification of *Arthrobacter simplex* (Jensen) Lochhead in the genus *Nocardioides* (Prauser) emend. O'Donnell et al. as *Nocardioides simplex*. *Arch. Microbiol.* **133**:323-329.
- Dryden, S. C., und S. Kaplan.** 1990. Localization and structural analysis of the ribosomal RNA operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *Nucleic Acids Res.* **18**:7267-7277.
- Dubey, S. K., und D. S. Holmes.** 1995. Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:257-265.
- Dunleavy, J. M.** 1989. *Curtobacterium plantarum* sp. nov. is ubiquitous in plant leaves and is seed transmitted in soybean and corn. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:240-249.
- Ederer, M. M., Crawford, R. L., Herwig, R. P., und C. S. Orser.** 1997. PCP degradation is mediated by closely related strains of the genus *Sphingomonas*. *Mol. Ecol.* **6**:39-49.
- Ehrmann, M., Ludwig, W., und K. H. Schleifer.** 1992. Species specific oligonucleotide probe for the identification of *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:453-455.
- Embley, T. M., und E. Stackebrandt.** 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:257-289.
- Faude, U. C., und M. G. Höfle.** 1997. Development and application of monoclonal antibodies for in situ detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**:4534-4542.
- Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368-376.
- Fiedler, F., und O. Kandler.** 1973. Die Mureintypen in der Gattung *Cellulomonas* Bergey et

- al. Arch. Microbiol. **89**:41-50.
- Fitch, W. M., und E. Margoliash.** 1967. Construction of phylogenetic trees. Science **155**:279-284.
- Fitch, W.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Syst. Zool. **20**:406-416.
- Fox, G. E., Pechman, K. R. und C. R. Woese.** 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to procaryotic systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. **27**:44-57.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., und P. Jurtshuk.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Bacteriol. **42**:166-170.
- Fredrickson, H. L., Cappenberg, T. E., und J. de Leeuw.** 1986. Polar lipid fatty acid compositions of Lake Vechten seston - an ecological application of lipid analysis. FEMS Microb. Ecol. **38**:381-396.
- French, J. C., Howells, J. D., und L. E. Anderson.** 1970. US Patent 3551294.
- Frostegard, A., Tunlid, A., und E. Baath.** 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. Appl. Environm. Microbiol. **59**:3605-3617.
- Fulco, A. J.** 1969. The biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli. I. Temperature induction of the denaturation reaction. J. Biol. Chem. **244**:889-895.
- Gilbert, E. S., und D. E. Crowley.** 1997. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. Appl. Environm. Microbiol. **63**:1933-1938.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., und N. R. Pace.** 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. J. Bacteriol. **170**:720-726.
- Gledhill, W. E., und L. E. Casida, Jr.** 1969. Predominant catalase-negative soil bacteria. III. *Agromyces*, gen. nov., microorganisms intermediary to *Actinomyces* and *Nocardia*. Appl. Microbiol. **18**:340-349.
- Goodfellow, M.** 1984. Reclassification of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in the genus *Rhodococcus* as *Rhodococcus fascians* comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. **5**:225-229.
- Groth, I.** 1996. *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**:234-239.
- Guckert, J. B., Ringelberg, D. B., White, D. C., Hanson, R. S., und B. J. Bratina.** 1991. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methy-lotrophs within the *Proteobacteria*. J. Gen. Microbiol. **137**:2631-2641.
- Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R., und H. F. Noller.** 1985. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. Prog. Nucl. Acid Res. Molec. Biol. **32**:166-216.

- Haack, S. K., Garchow, H., Odelson, D. A., Forney, L. J., und M. J. Klug.** 1994. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environm. Microbiol.* **52**:794-801.
- Häggblom, M., Nohynek, L. J., Palleroni, N. J., Kronqvist, K., Nurhiah-Lassila, E.-L., Salkanija-Salonen, M. S., Klatte, S., und R. M. Kroppenstedt.** 1994. Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti et al., 1986) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenolicum* com. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:485-493.
- Hahn, D., Amann, R. I., Ludwig, W., Akkermans, A. D. L., und K.-H. Schleifer.** 1992. Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* **138**:879-887.
- Harwood, J. L., und N. J. Russell.** 1984. Lipids in plants and microbes. George Allen and Unwin Co., London.
- Haugland, R.P.** 1996. Handbook of fluorescent probes and research chemicals, Molecular Probes, Inc.
- Henningson, P. J., und N. C. Gudmestad.** 1991. Fatty acid analysis of phytopathogenic coryneform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **137**:427-440.
- Higson, F. K.** 1992. Microbial degradation of biphenyl and its derivatives. *Adv. Appl. Microbiol.* **37**:135-164.
- Höfle, M. G.** 1988. Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Meth.* **8**:235-248.
- Höfle, M.** 1992. Aquatic microbial community structure and dynamics during large scale release of bacteria as revealed by low-molecular-weight RNA analysis. *Appl. Environm. Microbiol.* **58**:3387-3394.
- Höfle, M., und I. Brettar.** 1995. Taxonomic diversity and metabolic activity of microbial communities in the water column of the central Baltic. *Limnol. Oceanogr.* **40**:868-874.
- Hönerlage, W., Hahn, D., und D. Zeyer.** 1995. Detection of mRNA of *nprM* in *Bacillus megaterium* ATCC 14581 grown in soil by whole-cell hybridization. *Arch. Microbiol.* **163**:235-241.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., und N. R. Pace.** 1998. Impact of cultur-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**:4765-4774.
- James, B. D., Olsen, G. J., und N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic comparative analysis of RNA secondary structure. *Methods in Enzymology* **180**:227-239.
- Jantzen, E., und E. Bryn.** 1985. Whole-cell and lipopolysaccharide fatty acids and sugars of Gram-negative bacteria, pp. 145-171. *In*: Goodfellow, M., und D. E. Minnikin (ed.), Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, New York.
- Jannasch, H. W., und G. E. Jones.** 1959. Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnology and Oceanography* **4**:128-139.
- Jin, L., und M. Nei.** 1990. Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **7**:82-102.

- Jukes, T. H., und C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, pp. 21-132. *In*: H. N. Munro (ed.), Mammalian Protein Metabolism, Academic Press, New York.
- Kämpfer, P., Seiler, H., und W. Dott.** 1993. A numerical classification of coryneform bacteria and related taxa. *Gen. Appl. Microbiol.* **39**:135-214.
- Kämpfer, P., und R. Kroppenstedt.** 1996a. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can. J. Microbiol.* **42**:989-1005.
- Kämpfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Böhringer, J., Wagner, M., und R. Amann.** 1996b. Characterization of bacterial communities from activated sludge: Culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb. Ecol.* **32**:101-121.
- Kaneda, T.** 1972. Positional reference of fatty acids in phospholipids of *Bacillus cereus* and its relation to growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **280**:297-305.
- Kapuciski, J., und B. Skoczylas.** 1977. Simple and rapid fluorometric method for DNA microassays. *Anal. Biochem.* **83**:252-257.
- Kates, M.** 1964. Bacterial lipids. *Advances in Lipid Research* **2**:17-90.
- Keddie, R. M., und G. L. Cure.** 1977. The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. *J. Appl. Bacteriol.* **42**:229-252.
- Keddie, R. M., Collins, M. D. und D. Jones.** 1986. Genus *Arthrobacter* Conn and Dimmick 1947, 300 ^{AL}, pp. 1288-1301. *In*: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, und J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kefford, B., Kjelleberg, S., und K. C. Marshall.** 1982. Bacterial scavenging: utilization of fatty acids localized at a solid liquid interface. *Arch. Microbiol.* **133**:257-260.
- Kieft, T. L., Ringelberg, D. B., und D. C. White.** 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**:3292-3299.
- Kjelleberg, S.** 1984. Effects of interfaces on survival mechanisms of copiotrophic bacteria in low-nutrient habitats, pp. 151-159. *In*: M. Klug und C.A. Reddy (ed.), Current perspectives in microbial ecology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Klatte, S., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Altendorfer, K., und F. A. Rainey.** 1996. *Gordona hirsuta* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:876-880.
- Knackmuss, H. J.** 1984. Biochemistry and practical implementations of organohalide degradation, p. 687-693. *In*: M. J. Klug und C. A. Reddy (ed.). Current perspectives in microbial ecology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Koch, C., Rainey, F. A., und E. Stackebrandt.** 1994. 16S rDNA studies on members of *Arthrobacter* and *Micrococcus*: An aid for their future taxonomic restructuring. *FEMS Microb. Lett.* **123**:167-172.

- Koch, C., Klatte, S., Schumann, P., Burghardt, J., Kroppenstedt, R. M., und E. Stackebrandt. 1995a. Transfer of *Arthrobacter picolinophilus* Tate and Ensign 1974 to *Rhodococcus erythropolis*. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:576-577.
- Koch, C., Schumann, P., und E. Stackebrandt. 1995b. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:837-839.
- Kodama, Y., Yamamoto, H., Amano, N., und T. Amachi. 1992. Reclassification of two strains of *Arthrobacter oxydans* and proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**:234-239.
- Kohler, H. P. E., Kohler-Staub, D., und D. D. Focht. 1988. Cometabolism of polychlorinated biphenyls: enhanced transformation of Aroclor 1254 by growing bacterial cells. Appl. Environm. Microbiol. **54**:1940-1945.
- Kohring, L. L., Ringelberg, D. B., Devereux, R., Stahl, D. A., Mittelman, M. W., und D. C. White. 1994. Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **119**:303-308.
- Kollöffel, B., Burri, S., Meile, L., und M. Teuber. 1997. Development of 16S rRNA oligonucleotide probes for *Brevibacterium*, *Micrococcus/Arthrobacter* and *Microbacterium/Aureobacterium* used in dairy starter cultures. System. Appl. Microbiol. **20**:409-417.
- Korber, D. R., Lawrence, J. R., Sutton, B., und D. E. Caldwell. 1989. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot+ and Mot- *Pseudomonas fluorescens*. Microb. Ecol. **18**:1-19.
- Korber, D. R., Lawrence, J. R., Zhang, L., und D. E. Caldwell. 1990. Effects of gravity on bacterial deposition and orientation in laminar flow environments. Biofouling **2**:335-350.
- Korber, D. R., Lawrence, J. R., Hendry, M. J., und D. E. Caldwell. 1992. Programs for determining representative areas of microbial biofilms. Binary **4**:204-210.
- Korber, D. R., James, G. A., und J. W. Costerton. 1994. Evaluation of fleroxacin activity against established *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Appl. Environm. Microbiol. **60**:1663-1669.
- Korber, D. R., Choi, A., Wolfaardt, G. M., Ingham, S. C., und D. E. Caldwell. 1997. Substratum topographie influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms to trisodium phosphate. Appl. Environm. Microbiol. **63**:3352-3358.
- Kostiwi, L. L., Boylen, C. W., und B. J. Tyson. 1972. Lipid composition of growing and starving cells of *Arthrobacter crystallopoietes*. J. Bacteriol. **111**:102-111.
- Krawiec, S., und M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. Microbiol. Rev. **54**:502-539.
- Kroppenstedt, R. M. 1985. Fatty acid and menachinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Goodfellow, M., und D. E. Minnikin (ed.), Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, New York.

- Kündig, C., Beck, C., Hennecke, H., und M. Göttfert.** 1995. A single rRNA gene region in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. **177**:5151-5154.
- Lambert, M. A., und C. W. Moss.** 1983. Comparison of the effects of acid and base hydrolyses on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria. J. Clin. Microbiol. **18**:1370-1377.
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp.115-175. In: E. Stackebrandt und M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Larsen, N., Olsen, G. J., Maidak, B. L., McCaughey, M., Overbeek, J. R., Macke, T. J., Marsh, T. L., und C. R. Woese.** 1993. The Ribosomal Database Project. Nucleic Acids Res. **21**:3021-3023.
- Law, J. H., Zalkin, H., und T. Kaneshiro.** 1963. Transmethylation reactions in bacterial lipids. Biochim. Biophys. Acta **70**:143-151.
- Lawrence, J. R., Wolfaardt, G. M., und T. R. Neu.** 1998. The study of biofilms using confocal laser scanning microscopy. In: M. H. F. Wilkinson und F. Schut (ed.), Digital image analysis of microbes. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Lechevalier, M. P., De Bievre, C., und H. Lechevalier.** 1977. Chemotaxonomy of aerobic Actinomycetes: phospholipid composition. Biochem. Syst. Ecol. **5**:249-60.
- Lechevalier, M. P., Stern, A. E., und H. A. Lechevalier.** 1981. Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes, pp. 111-116. In: Schaal/Pulverer (ed.). Actinomycetes, Zbl. Bakt. Suppl. 11. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Lechevalier, M. P.** 1982. Lipids in bacterial taxonomy, pp. 435-541. In: Laskin, A. I., und H. A. Lechevalier (ed.), CRC handbook of microbiology. CRC Press, Inc. Boca Raton, La.
- Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., und R. K. Wilson.** 1992. DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. Nucleic Acids Res. **20**:2471-2483.
- Ludwig, W., und K. H. Schleifer.** 1995. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev. **15**:155-173.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., und K. H. Schleifer.** 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis **19**:554-568.
- Macario, A. J. L., und E. Convay de Macario.** 1983. Antigenic fingerprinting of methanogenic bacteria with polyclonal antibody probes. Syst. Appl. Microbiol. **4**:451-458.
- Macario, A. J. L., und E. Convay de Macario.** 1985. Monoclonal antibodies against bacteria, vol. III. Academic Press, Inc.
- Macnaughton, S. J., O'Donnell, A. G., und T. M. Embley.** 1994. Permeabilization of mycolic-acid-containing actinomycetes for in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotide probes. Microbiology **140**:2859-2865.

- McAllister, K. A., Lee, H., und J. T. Trevors.** 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* **7**:1-40.
- Maidak, B. L., Larsen, N., McCaughey, M. J., Overbreek, R., Olsen, G. J., Fogel, K., Blandy, J., und C. R. Woese.** 1994. The Ribosomal Database Project. *Nucl. Acids. Res.* **22**:3485-3487.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., und K. H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.
- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.-H., und T.-A. Stenström.** 1993. In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**:2293-2298.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., und K. H. Schleifer.** 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacterioides in the natural environment. *Microbiology* **140**:1097-1106.
- Marr, A. G., und J. L. Ingram.** 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**:1260-1267.
- Martin, K., Schumann, P., Rainey, F. A., Schuetze, B., und I. Groth.** 1997. *Janibacter limosus* gen. nov., sp. nov., a new actinomycete with meso-diaminopimelic acid in the cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:529-534.
- Massol-Deyá, A. A., Whalon, J., Hickey, R. F., und J. M. Tiedje.** 1995. Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environm. Microbiol.* **61**:769-777.
- May, O., Siemann, M., Pietzsch, M., Kiess, M., Mattes, R., und C. Syldatk.** 1998. Substrate-depending enantioselectivity of a novel hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745: Purification and characterization as a new member of cyclic amidases. *J. Biotechn.* **61**:1-13.
- Mevarech, M., Hirsch-Twizer, S., Goldman, S., Jakobson, E., Eisenberg, H., und P. P. Dennis.** 1989. Isolation and characterization of the rRNA gene clusters of *Haloarcula marismortui*. *J. Bacteriol.* **171**:3479-3485.
- Miller, E. S., Woese, C. R., und S. Brenner.** 1991. Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:363-368.
- Minnikin, D. E., Goodfellow, M., und M. D. Collins.** 1978. Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa, pp. 85-160. *In: Coryneform Bacteria*. I. J. Bousfield und A. G. Calley (ed.). Academic Press, London und New York.
- Minnikin, D. E., Collins, M. D., und M. Goodfellow.** 1979. Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J. Appl. Bacteriol.* **47**:87-95.

- Møller, S., Korber, D. R., Wolfaardt, G. M., Molin, S., und D. E. Caldwell.** 1997. The impact of nutrient composition on a degradative community. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**:2432-2438.
- Møller, S., Sternberg, C., Andersen, J. B., Christensen, B. B., Ramos, J. L., Givskov, M., und S. Molin.** 1998. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: Evidence of metabolic interaction between community members. *Appl. Environm. Microbiol.* **64**:721-732.
- Murphy, R. C., und K. A. Harrison.** 1994. Fast atom bombardement mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom. Rev.* **13**:57-75
- Mutharia, L. M., und R. E. W. Hancock.** 1985. Monoclonal antibody for outer lipoprotein membrane of the *Pseudomonas fluorescens* group of the family *Pseudomonadaceae*. *Int. J. System. Bact.* **35**:350-352.
- Muyzer, G., De Waal, E., und A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**:695-700.
- Niepel, T., Meyer, H., Wray, V., und W.-R. Abraham.** 1997. A new type of glycolipid, 1-[α -mannopyranosyl-(1 α -3)-(6-O-acyl- α -mannopyranosyl)-3-O-acyl-glycerol], from *Arthrobacter atrocyaneus*. *Tetrahedron* **53**:3593-3602.
- Niepel, T., Meyer, H., Wray, V., und W.-R. Abraham.** 1998. Intraspecific variation of unusual phospholipids from *Corynebacterium spp.* containing a novel fatty acid. *J. Bacteriol.* **180**:4650-4657.
- Nogales, B., Moore, E., Abraham, W.-R., und K. N. Timmis.** 1999. Identification of the metabolically-active members of a bacterial community in a PCB-polluted moorland soil. *Environm. Microbiol.*, im Druck.
- Nunes, O. C., Donato, M. M., Manaia, C. M., und M. S. da Costa.** 1992. The polar lipid and fatty acid composition of *Rhodothermus* strains. *System. Appl. Microbiol.* **15**:59-62.
- Ogasawara, N., Nakai, S., und H. Yoshikawa.** 1994. Systematic sequencing of the 180 kilobase region of *Bacillus subtilis* chromosome containing the replication origin. *DNA Res.* **1**:1-14.
- Orgambide, G. G., Reusch, R. N., und F. B. Dazzo.** 1993. Methoxylated fatty acids reported in *Rhizobium* isolates arise from chemical alterations of common fatty acids upon acid-catalyzed transesterification procedures. *J. Bacteriol.* **175**:4922-4926.
- Ouverney, C. C., und J. A. Fuhrmann.** 1997. Increased fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**:2735-2740.
- Pace, N. R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**:734-740.
- Park, Y.-H., Hori, H., Suzuki, K.-I., Osawa, S., und K. Komagata.** 1987. Phylogenetic analysis of the coryneform bacteria by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **169**:1801-1806.

- Park, Y.-H., Yoon, J.-H., und S. T. Lee.** 1998. Application of multiplex PCR using species-specific primers within the 16S rRNA gene for rapid identification of *Nocardioides* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:895-900.
- Pelz, O., Hesse, C., Tesar, M., Coffin, R. B., und W.-R. Abraham.** 1997. Development of methods to measure carbon isotope ratios of bacterial biomarkers in the environment. *Isotopes Environ. Health Stud.* **33**:131-144.
- Pelz, O., Tesar, M., Frech, G., Faude, U., Wittich, R.-M., Moore, E. R. B., Timmis, K. N., und W.-R. Abraham.** 1999. Structural and functional characterization of a 4-chlorosalicylate-degrading bacterial consortium. *Environm. Microbiol.* **1**:167-174.
- Porter, K. G., und Y. S. Feig.** 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**:943-948.
- Poulsen, L., Ballard, K. G., und D. A. Stahl.** 1993. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**:1354-1360.
- Prauser, H.** 1976. *Nocardioides*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**:58-65.
- Prauser, H.** 1984. *Nocardioides luteus* spec. nov. *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**:647-648.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Tzagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., und K. Baumeister.** 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **38**:336-341.
- Rainey, F., Weiss, N., Prauser, H., und E. Stackebrandt.** 1994. Further evidence for the phylogenetic coherence of actinomycetes with group B-peptidoglycan and evidence for the phylogenetic intermixing of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**:135-140.
- Rainey, F. A., Weiss, N., und E. Stackebrandt.** 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Cellulomonas*, *Promicromonospora*, and *Jonesia* and proposal to exclude the genus *Jonesia* from the family *Cellulomonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:649-652.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Janssen, P. H., Hippe, H., und E. Stackebrandt.** 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogenous intervening sequences. *Microbiology* **142**:2087-2095.
- Ratledge, C., und S. G. Wilkinson.** 1988. An overview of microbial lipids, pp. 3-22. *In: Microbial lipids I.* Academic Press, London.
- Reischl, U., Emler, S., Horak, Z., Kaustova, J., Kroppenstedt, R. M., Lehn, N., und L. Naumann.** 1998. *Mycobacterium bohemicum* sp. nov., a new slow-growing scotochromogenic mycobacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1349-1355.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., und K.-H. Schleifer.** 1994. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* **140**:2849-2858.

- Rose, A. H.** 1989. Influence of the environment on microbial lipid composition, pp. 255-278. *In: Ratledge, C., und S. G. Wilkinson (ed.). 1989. Microbial lipids II. Academic Press, London.*
- Rozsak, D. B., und R. R. Colwell.** 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**:365-379.
- Sabourin, C. L., Carpenter, J. C., Leib, T. K., und J. L. Spivack.** 1996. Biodegradation of dimethylsilanediol in soils. *Appl. Environm. Microbiol.* **62**:4352-4360.
- Saiki, R. K., Scharf, S., und F. Faloona.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1530-1534.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., und S. Stoffel.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. *In: A laboratory manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, USA.*
- Sanger, F., Nicklen, S., und A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5463-5467.
- Sasaki, J., Chijimatsu, M., und K. Suzuki.** 1998. Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxikus* com. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:403-410.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note #101, MIDI, 115 Baksdale Prof. Center, Newark, DE 19711, USA.
- Schleifer, K.-H.** 1970. Die Mureintypen in der Gattung *Microbacterium*. *Arch. Mikrobiol.* **71**:271-282.
- Schleifer, K.-H., und O. Kandler.** 1972. Peptidoglycan types of bacteria cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**:407-477.
- Schmid, A., Rothe, B., Altenburger, J., Ludwig, W., und K. H. Engeser.** 1997. Characterization of three distinct extradiol dioxygenases involved in mineralization of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DPO360. *J. Bacteriol.* **179**:53-62.
- Schmidt, T. M., DeLong, E. F., und N. R. Pace.** 1991. Analysis of marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* **173**:4371-4378.
- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., und R. Amann.** 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**:3268-3273.
- Schuppler, M., Mertens, F., Schön, G., und U. B. Göbel.** 1995. Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. *Microbiology* **141**:513-521.
- Schuppler, M., Wagner, M., Schön, G., und U. B. Göbel.** 1998. *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiology* **144**:249-259.

- Seiler, H.** 1983. Identification key for coryneform bacteria derived from numerical taxonomic studies. *J. Gen. Microbiol.* **37**:143-187.
- Shaw, N., und D. Stead.** 1971. Lipid composition of some species of *Arthrobacter*. *J. Bacteriol.* **107**:130-133.
- Skerrat, J. H., Nichols, P. D., Mancuso, C. A., James, S. R., Dobson, S. J., McMeekin, T. A., und H. Burton.** 1991. The phospholipid ester-linked fatty acid composition of members of the family *Halomonadaceae* and genus *Flavobacterium*: a chemotaxonomic guide. *System. Appl. Microbiol.* **14**:8-13.
- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., und K.-H. Schleifer.** 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**:2884-2896.
- Snyder, L., und W. Champness.** 1997. Molecular genetics of bacteria. ASM Press, Washington, DC.
- Southwick, P. L., Ernst, L. A., Tauriello, E. W., Parker, S. R., Mujumdar, R. B., Clever, H. A., und A. S. Waggoner.** 1990. Cyanine dye labelling reagents – carboxy-methylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry* **11**:418-430.
- Stackebrandt, E., Fiedler, F., und O. Kandler.** 1978. Peptidoglycan type and cell wall polysaccharide composition of *Cellulomonas cartalyticum* and some coryneform organisms. *Arch. Microbiol.* **117**:115-118.
- Stackebrandt, E., Lewis, B. J., und C. R. Woese.** 1980a. The phylogenetic structure of the coryneform group of bacteria. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* **1**:137-149.
- Stackebrandt, E., Häringer, M. und K.-H. Schleifer.** 1980b. Molecular genetic evidence for the transfer of *Oerskovia* species into the genus *Cellulomonas*. *Arch. Microbiol.* **127**:179-185.
- Stackebrandt, E., Seiler, H., und K. H. Schleifer.** 1982. Union of the genera *Cellulomonas* Bergey et al. and *Oerskovia* Prauser et al., in a redefined genus *Cellulomonas*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* **3**:401-409.
- Stackebrandt, E., Fowler, V. J., Fiedler, F., und H. Seiler.** 1983. Taxonomic studies on *Arthrobacter nicotianae* and related taxa: Description of *Arthrobacter uratoxydans* sp. nov. and *Arthrobacter sulfureus* sp. nov. and reclassification of *Brevibacterium protophormiae* as *Arthrobacter protophormiae* comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* **4**:470-486.
- Stackebrandt, E., und R. M. Kiedde.** 1986. Genus *Cellulomonas* Bergey et al. 1923, 154, emend. mut. char. Clark 1952, 50 425 ^{AL}, pp. 1325-1329. In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, und J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Stackebrandt, E., und B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846-849.

- Stackebrandt, E., und F. A. Rainey.** 1995. Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.1.1**:1-17.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., und N. L. Ward-Rainey.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:479-491.
- Stahl, D., und R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, pp. 205-248. *In*: E. Stackebrandt und M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, John Wiley, New York.
- Stayley, J. T., und A. Konopka.** 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:321-346.
- Stewart, G. C., Wilson, F. E., und K. F. Bott.** 1982. Detailed physical mapping of the ribosomal RNA genes of *Bacillus subtilis*. *Gene* **19**:152-162.
- Stoesser, G., Moseley, M. A., Sleep, J., McGowran, M., Garcia-Pastor, M., und P. Sterk.** 1998. The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* **26**:8-15.
- Strunk, O., und W. Ludwig.** 1997. ARB software program package; <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>.
- Suzuki, K., Kaneko, T., und K. Komagata.** 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**:131-138.
- Suzuki, K., und K. Komagata.** 1983. Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some coryneform bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**:188-200.
- Suzuki, K., Goodfellow, M., und A. G. O'Donnell.** 1993. Cell envelopes and classification, pp. 195-250. *In*: M. Goodfellow und A. G. O'Donnell (ed.), *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press, London.
- Suzuki, K., und K. Komagata.** 1983. *Pimelobacter* gen nov., a new genus of coryneform bacteria with LL-diaminopimelic acid in the cell wall. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**:59-71.
- Suzuki, K.-I., Sasaki, J., Uramoto, M., Nakase, T., und K. Komagata.** 1996. *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov, a species for "*Corynebacterium mediolanum*" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:88-93.
- Swofford, D. L., und G. J. Olsen.** 1990. Phylogeny reconstruction, pp. 411-505. *In*: D. Hillis und C. Moritz (ed.), *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Takeuchi, M., und A. Yokota.** 1994. Phylogenetic analysis of the genus *Microbacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**:11-16.
- Takeuchi, M., und K. Hatano.** 1998. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:793-747.
- Tamura, T., und A. Yokota.** 1994. Transfer of *Nocardioides fastidiosa* Collins and Stackebrandt 1989 to the genus *Aeromicrobium* as *Aeromicrobium fastidiosum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:608-611.

- Tesar, M., Hoch, C., Moore, E. R. B., und K. N. Timmis.** 1996. Westprinting: Development of a rapid immunochemical identification for species within the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *System. Appl. Microbiol.* **19**:577-588.
- Tunlid, A., und D. C. White.** 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil, pp. 229-262. *In*: G. Stotzky und J. M. Bollag (ed.), *Soil biochemistry*, Vol. 7. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., und J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial sytematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407-438.
- Vaneechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gilis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., und K. Kersters.** 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadeceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**:227-234.
- Vauterin, L., Yang, P., und J. Swings.** 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for differentiation of new *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:298-304.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., und K.-H. Schleifer.** 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for Proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**:792-800.
- Wang, P., und S. Krawiec.** 1994. Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains. *Arch. Microbiol.* **161**:266-271.
- Ward, D. M., Weller, R., und M. M. Bateson.** 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**:63-65.
- White, D. C., Davis, W. M., Nickels, J. S., King, J. D., und R. J. Bobbie.** 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia* **40**:51-62.
- White, D. C.** 1986. Environmental effects testing with quantitative microbial analysis: chemical signatures correlated with *in situ* biofilm analysis by FT/IR. *Toxicity Assesment* **1**:315-338.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. und W. J. Wiebe.** 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6578-6583.
- Wilson, K.** 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. *In*: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmann, J.A. Smith and K.Struhl (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R., und H. F. Noller.** 1983. Detailed higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleotid acids. *Microbiol. Rev.* **47**:621-669.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **52**:221-271.
- Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., und D. E. Caldwell.** 1994. Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**:434-446.

- Yamada, K., und K. Komagata.** 1972. Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **18**:417-431.
- Yokota, A., Takeuchi, M., Sakane, T., und N. Weiss.** 1993. Proposal of six new species in the genus *Aureobacterium* and transfer of *Flavobacterium esteraromaticum* Omelianski to the genus *Aureobacterium* as *Aureobacterium esteraromaticum* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**:555-564.
- Yoon, J.-H., Lee, J.-S., Shin, Y. K., Park, Y.-H., und S. T. Lee.** 1997. Reclassification of *Nocardioides simplex* ATCC 13260, ATCC 19595, and ATCC 19566 as *Rhodococcus erythropolis*. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**:904-907.
- Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Neef, A., Amann, R. I., und R. Zeyer.** 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. Arch. Microbiol. **168**:185-192.
- Zuckerkindl, E., und L. Pauling.** 1965. Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol. **8**:357-366.
- Zgurskaya, H. I., Evtushenko, L. I., Akimov, V. N., Voyedo, H. V., Dobrovolskaya, T. G., Lysak, L. V., und L. V. Kalakoutskii.** 1992. Emended description of the genus *Agromyces* and description of *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces cerinus* subsp. *nitratius* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces fucosus* subsp. *fucosus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces fucosus* subsp. *hippuratus* sp. nov., subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**:635-641.

7. Anhang

Tab. 7.1: Derzeit anerkannte Arten der Gattung *Aeromicrobium*, *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Nocardioides*, *Terrabacter*

| Arten | Typstamm |
|--|------------------------|
| <i>Aeromicrobium erythreum</i> (Typart) | DSM 8599 (LMG 1642) |
| <i>Aeromicrobium fastidiosum</i> | DSM 10552 (LMG 16205T) |
| <i>Agromyces cerinus</i> | DSM 8595 (LMG 16155) |
| <i>Agromyces fucosus</i> | DSM 8597 (LMG 16588) |
| <i>Agromyces mediolanus</i> | DSM 20152 |
| <i>Agromyces ramosus</i> (Typart) | DSM 43045 (LMG 16680) |
| <i>Arthrobacter agilis</i> | DSM 20550 |
| <i>Arthrobacter atrocyaneus</i> | DSM 20127 (LMG 3814) |
| <i>Arthrobacter aurescens</i> | DSM 20116 (LMG 3815) |
| <i>Arthrobacter citreus</i> | DSM 20133 (LMG 16338) |
| <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> | DSM 20117 (LMG 3819) |
| <i>Arthrobacter cumminsii</i> | DSM 10493 |
| <i>Arthrobacter duodecadis</i> | ATCC 13347 (LMG 17308) |
| <i>Arthrobacter globiformis</i> (Typart) | DSM 20124 (LMG 3813) |
| <i>Arthrobacter histidinovorans</i> | DSM 20115 (LMG 3822) |
| <i>Arthrobacter ilicis</i> | DSM 20138 (LMG 3659) |
| <i>Arthrobacter mysorens</i> | ATCC 33408 (LMG 16219) |
| <i>Arthrobacter nicotianae</i> | DSM 20123 (LMG 16305) |
| <i>Arthrobacter nicotinovorans</i> | DSM 420 (LMG 16253) |
| <i>Arthrobacter oxydans</i> | DSM 20119 (LMG 3816) |
| <i>Arthrobacter pascens</i> | DSM 20545 (LMG 16255) |
| <i>Arthrobacter picolinophilus</i> | DSM 20665 (LMG 16262) |
| <i>Arthrobacter polychromogenes</i> | DSM 20136 (LMG 3821) |
| <i>Arthrobacter protophormiae</i> | DSM 20168 (LMG 16324) |
| <i>Arthrobacter ramosus</i> | DSM 20546 (LMG 16256) |
| <i>Arthrobacter siderocapsulatus</i> | VKM-B 1122 (LMG 16206) |
| <i>Arthrobacter sulfureus</i> | DSM 20136 (LMG 16694) |
| <i>Arthrobacter uratoxydans</i> | DSM 20647 (LMG 16220) |
| <i>Arthrobacter ureafaciens</i> | DSM 20126 (LMG 3812) |
| <i>Arthrobacter viscosus</i> | DSM 7307 (LMG 16473) |
| <i>Arthrobacter woluwensis</i> | DSM 10495 |

| | |
|--|-----------------------|
| <i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> | DSM 8611 (LMG 16469) |
| <i>Microbacterium arborescens</i> | DSM 20754 |
| <i>Microbacterium aurantiacum</i> | DSM 12506 |
| <i>Microbacterium aurum</i> | DSM 8600 |
| <i>Microbacterium barkeri</i> | DSM 20145 (LMG 16341) |
| <i>Microbacterium chocolateum</i> | DSM 12507 |
| <i>Microbacterium dextranolyticum</i> | DSM 8607 |
| <i>Microbacterium esteraromaticum</i> | DSM 8609 (LMG 4020) |
| <i>Microbacterium flavescens</i> | DSM 20643 (LMG 3028) |
| <i>Microbacterium halophilum</i> | DSM 12508 |
| <i>Microbacterium hominis</i> | DSM 12509 |
| <i>Microbacterium imperiale</i> | DSM 20530 |
| <i>Microbacterium keratanolyticum</i> | DSM 8606 (LMG 16470) |
| <i>Microbacterium ketosireducens</i> | DSM 12510 |
| <i>Microbacterium lacticum</i> (Typart) | DSM 20427 |
| <i>Microbacterium laevaniformans</i> | DSM 20140 |
| <i>Microbacterium liquefaciens</i> | DSM 20638 (LMG 16342) |
| <i>Microbacterium luteolum</i> | DSM 20143 (LMG 16207) |
| <i>Microbacterium maritypicum</i> | DSM 12512 |
| <i>Microbacterium oxydans</i> | DSM 20578 |
| <i>Microbacterium saperdae</i> | DSM 20169 (LMG 16343) |
| <i>Microbacterium schleiferi</i> | DSM 20489 (LMG 16153) |
| <i>Microbacterium terrae</i> | DSM 8610 (LMG 16471) |
| <i>Microbacterium terregens</i> | DSM 20449 (LMG 16258) |
| <i>Microbacterium testaceum</i> | DSM 20166 (LMG 16344) |
| <i>Microbacterium thalassium</i> | DSM 12511 |
| <i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> | DSM 8608 (LMG 16696) |
| <i>Cellulomonas biazotea</i> | DSM 20122 (LMG 16695) |
| <i>Cellulomonas cellasea</i> | DSM 20118 (LMG 16323) |
| <i>Cellulomonas cellulans</i> | DSM 43189 (LMG 16221) |
| <i>Cellulomonas fermentans</i> | DSM 3133 (LMG 16154) |
| <i>Cellulomonas fimi</i> | DSM 20113 (LMG 16345) |
| <i>Cellulomonas flavigena</i> (Typart) | DSM 20109 (LMG 16263) |
| <i>Cellulomonas gelida</i> | DSM 20111 (LMG 16697) |
| <i>Cellulomonas hominis</i> | DSM 9581 |
| <i>Cellulomonas turbata</i> | DSM 20577 (LMG 4072) |
| <i>Cellulomonas uda</i> | DSM 20107 (LMG 16327) |

| | |
|---|-----------------------|
| <i>Curtobacterium albibum</i> | DSM 20512 (LMG 8759T) |
| <i>Curtoabcterium citreum</i> (Typart) | DSM 20528 (LMG 8786T) |
| <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> | NCPPB 1446 |
| <i>Curtobacterium luteum</i> | DSM 20542 (LMG 8787) |
| <i>Curtobacterium plantarum</i> | DSM 7069 (LMG 16222) |
| <i>Curtobacterium pusillum</i> | DSM 20527 (LMG 8788) |
| <i>Nocardioides albus</i> (Typart) | DSM 43109 (LMG 16212) |
| <i>Nocardioides jensenii</i> | DSM 20641 (LMG 16325) |
| <i>Nocardioides luteus</i> | DSM 43366 (LMG 16209) |
| <i>Nocardioides plantarum</i> | DSM 11054 (LMG 16210) |
| <i>Nocardioides pyrdinolyticus</i> | OS4 |
| <i>Nocardioides simplex</i> | DSM 20130 (LMG 16261) |
| <i>Terrabacter tumescens</i> (Typart) | DSM 43109 (LMG 16212) |
